

UNIVERSIDAD DE GRANADA

Programa de Bioquímica y Biología Molecular



TESIS DOCTORAL

NUEVOS AVANCES EN LA REPRODUCCIÓN

ASISTIDA, MEJORA DE LA CALIDAD

OVOCITARIA Y DE LA RECEPTIVIDAD

UTERINA.

RAQUEL MENDOZA TESARIK

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Raquel Mendoza Tesarik
ISBN: 978-84-1306-253-2
URI: <http://hdl.handle.net/10481/56473>

*Le dedico esta tesis a mis padres, mi marido,
mis hijos y a todas esas mujeres que ponen en
nuestras manos su mayor sueño.*

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS

<u>INTRODUCCIÓN</u>	1
1. CICLO OVÁRICO	4
1.1. Etapa gonadal indiferenciada	7
1.2. Etapa de diferenciación	7
1.3. Etapa de multiplicación de ovogonias y formación del ovocito	7
1.4. Etapa de formación del folículo	8
2. FASES DEL CICLO OVÁRICO	9
2.1. Fase folicular	10
2.1.1. Folículo primordial	10
2.1.2. Folículo preantral	10
2.1.3. Folículo antral	13
2.1.4. Folículo preovulatorio	13
2.2. Sistema cíclico de la fase folicular	15
2.2.1. Reclutamiento	15
2.2.2. Selección	15
2.2.3. Dominancia	16
2.3. Fase ovulatoria	16
2.4. Fase lútea	17
3. ESTIMULACIÓN OVÁRICA	21
3.1. Selección de las pautas de tratamiento	23
4. GONADOTROPINAS	25
4.1. Papel de la FSH	25
4.2. Papel de la LH	26
4.3. Factores que influyen en la estimulación óptima	26
4.3.1. Aumento y extensión del crecimiento interciclo de la FSH en la fase inicial de la estimulación y bloqueo hipofisario en la fase final de la estimulación	26
4.3.2. Superación del valor “umbral” y del periodo “ventana” de la FSH	28
4.3.3. Mantenimiento de los niveles plasmáticos adecuados de LH	29

5. HORMONA DEL CRECIMIENTO	30
6. MODELO DE PROTOCOLO DE ESTIMULACIÓN OVÁRICA	31
7. PUNCIÓN FOLICULAR Y RECOGIDA OVOCITARIA	33
7.1. Calidad del citoplasma	34
7.2. Calidad del extracitoplasma	34
7.3. Calidad del complejo Cúmulus-corona radiata-ovocito	35
8. REPRODUCCIÓN ASISTIDA	36
9. CALIDAD EMBRIONARIA	37
9.1. Día 1	37
9.2. Día 2 y día 3	39
9.3. Día 4, día 5 y día 6	43
10. TRANSFERENCIA EMBRIONARIA	46
11. SOPORTE DE LA FASE LÚTEA	47
12. OBJETIVOS	48
<u>MATERIAL Y MÉTODOS</u>	49
1. PARTICIPANTES EN LOS ESTUDIOS	50
1.1. Estudio sobre el efecto de la hormona de crecimiento (GH) sobre la calidad ovocitaria y embrionaria	50
1.2. Estudio del efecto de la hormona de crecimiento (GH) sobre la receptividad uterina	52
1.3. Estudio sobre el efecto del agonista de la GnRH sobre la receptividad uterina	54
2. PROTOCOLOS DE ESTIMULACIÓN OVÁRICA	57
2.1. Protocolo largo con agonista de la GnRH	57
2.2. Protocolo con antagonista de la GnRH	57
3. PUNCIÓN FOLICULAR	59
3.1. Preparación del material	60
3.2. Proceso de obtención y lavado de ovocitos	60
4. MICROINYECCIÓN INTRACITOPLÁSMICA DEL ESPERMATOZOIDE	62
4.1. Preparación de la muestra de esperma	62
4.2. Preparación de los ovocitos	63
4.3. Preparación del sistema y proceso de microinyección	64

5. MARCADORES DE CALIDAD OVOCITARIA	67
5.1. Tamaño y forma del ovocito	68
5.2. Citoplasma	70
5.3. Primer corpúsculo polar	72
5.4. Zona pelúcida	74
5.5. Espacio perivitelino	76
5.6. Retículo endoplasmático	78
5.7. Membrana plasmática	79
5.8. Recepción del espermatozoide	80
5.9. Cono de inyección	81
6. MARCADORES DE CALIDAD EN EL CIGOTO (Día 1 del desarrollo)	84
6.1. Pronúcleos	84
6.2. Corpúsculos polares	86
7. MARCADORES DE CALIDAD DE LOS EMBRIONES (Día 3 del desarrollo)	87
8. CULTIVO EMBRIONARIO	90
9. SELECCIÓN DE LOS EMBRIONES PARA LA TRANSFERENCIA	91
10. ADMINISTRACIÓN DE SUPLEMENTOS DE LA FASE LÚTEA	92
11. DETERMINACIONES HORMONALES	93
12. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	95
<u>RESULTADOS</u>	97
1. Efecto de la hormona de crecimiento sobre la calidad de los ovocitos y los embriones	98
2. Efecto de la hormona de crecimiento sobre la receptividad uterina	103
3. Efecto del agonista de la GnRH sobre la receptividad uterina	108
<u>DISCUSIÓN</u>	111
1. El efecto de la GnRH sobre la calidad ovocitaria y la receptividad uterina	113
2. Mejora de la fase lútea mediante la administración de un agonista de la GnRH	115
<u>CONCLUSIONES</u>	121
<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	123

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecerle de manera especial a mi madre, Carmen Mendoza Oltras, su perseverancia, tenacidad y dedicación. Por todo lo que me ha enseñado y porque sin ella, esta tesis no hubiera sido posible.

A mi padre, Jan Tesarik, mi maestro, siempre ayudándome y enseñándome lo bonito que es la investigación y esta profesión.

A mis Directores de tesis Esperanza Ortega Sánchez y Nicolás Mendoza Ladrón de Guevara por acogerme bajo su tutela y darme la oportunidad de presentar esta tesis.

A mi compañera Maribel Galán Lázaro que siempre está a mi lado acompañándome en todo lo que necesito.

A Cristina Conde López, la nueva incorporación de la empresa, por su inestimable ayuda y apoyo moral.

A mis compañeros de la Clínica MAR&GEN, Tamara Pérez, Rocío Guiral, Almudena Cara, Mariella Secchi, Piero Di Cesare, Torcuato Porcel, por ser un magnífico equipo y animarme siempre.

INTRODUCCIÓN



En España, existe alrededor de un 17% de parejas infértiles, lo que significa que no es que sean incapaces de concebir un hijo sino que tienen problemas de fertilidad, bien porque durante un tiempo razonable no hayan conseguido un embarazo de forma natural o porque aunque lo logran, no llega a término. Según los datos existentes, alrededor de un 40% de parejas infértiles es por causa masculina, otro 40 % por causa femenina y un 20% por causas desconocidas o mixtas, afectando a ambos componentes de la pareja.

Las causas pueden ser muy variadas pero en el hombre la más importante es la baja calidad del espermatozoide en cuanto a morfología se refiere. También es relevante la cantidad y la movilidad, pero son parámetros más estables dentro de la población, mientras que la morfología ha ido en claro descenso desde hace relativamente pocos años (*Carlsen E y col 1999; Andolz P y col. 1999*). La fragmentación del ADN, eyaculación retrógrada y azoospermia obstructiva o secretora, son igualmente causas de infertilidad masculina (*Borini A y col. 2006; Cohen-Bacrei P y col. 2009; Evenson DP y col 1999; Zhao M y col. 2004; Semiao L y col. 2010*).

En la mujer, ovarios poliquísticos, fallos en la ovulación, obstrucción o ausencia de trompas, endometriosis, mala calidad o baja respuesta ovocitaria, fase lútea deficiente y la edad, son las principales causas (*Urman B y col. 2004; Kollmann M y col. 2016; Surrey ES 2013; De Ziegler D y col. 2018; Broekmans F 2009; Padma R 2016; Tse Yeun Tan M y col. 2014; Abbas A y col. 2011*), observándose que a partir de los 35 años disminuye considerablemente la calidad ovocitaria y a partir de los 42 es casi muy difícil alcanzar en un embarazo (*Gougeon A 1993; De Brucker M y col. 2013; Hourvitz A y col. 2009*).

La pareja infértil, debe ser estudiada para poder emitir un diagnóstico adecuado y así establecer un tratamiento totalmente personalizado. Se les realiza a ambos componentes de la pareja, análisis hormonales, bioquímicos e inmunológicos. A la mujer, citología, control ecográfico para analizar el tamaño de los ovarios, número y tamaño de los folículos, tamaño del útero y endometrio. Y al hombre un espermiograma, espermocitograma, test de fragmentación y marcadores testiculares, prostáticos y vesiculares, si fuera necesario.



Una vez establecido el diagnóstico de infertilidad se procede a su tratamiento para lo cual la mujer va a tener que ser sometida a una estimulación ovárica. Pero antes, para entender dicho proceso vamos a comenzar por exponer el ciclo ovárico.



1. CICLO OVARICO

Alcanzada la madurez sexual en la mujer, el ovario experimenta periódicamente cambios fisiológicos que constituyen el **ciclo ovárico** (Fig. 1), y que persiguen dos finalidades interdependientes y perfectamente coordinadas, como son:

- Liberar ovocitos maduros.
- Producir hormonas esteroideas, responsables entre otras, de la formación del cuerpo lúteo y de la preparación del endometrio.

El proceso de la Ovogénesis (Fig. 2) se define como cambios madurativos que tienen lugar en las células germinales desde la etapa fetal hasta la vida adulta y que dan como resultado la existencia de células aptas para la fecundación.

La evolución del **folículo ovárico**, constituido por el ovocito y las células de la granulosa, comienza desde la simplicidad del *folículo primordial* hasta llegar a la complejidad morfológica y funcional del *folículo antral*, con la existencia de un ovocito maduro y una serie de capas celulares encargadas de la síntesis y de la secreción hormonal. Según *Rabinovici J y Atwood AK* en 1990, se diferencian 4 etapas o fases del desarrollo del ovario fetal.



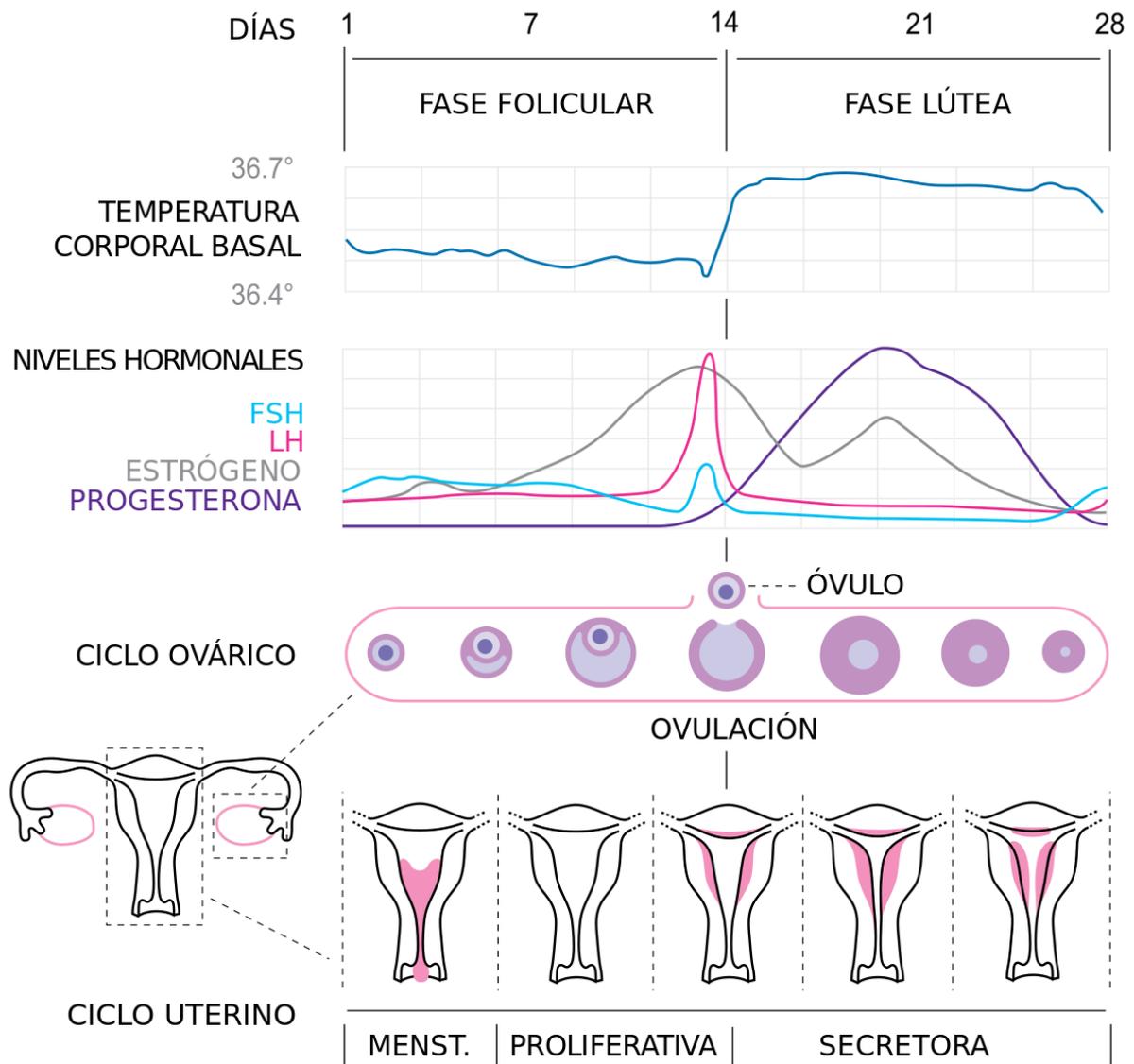


Fig. 1 Fases del ciclo ovárico



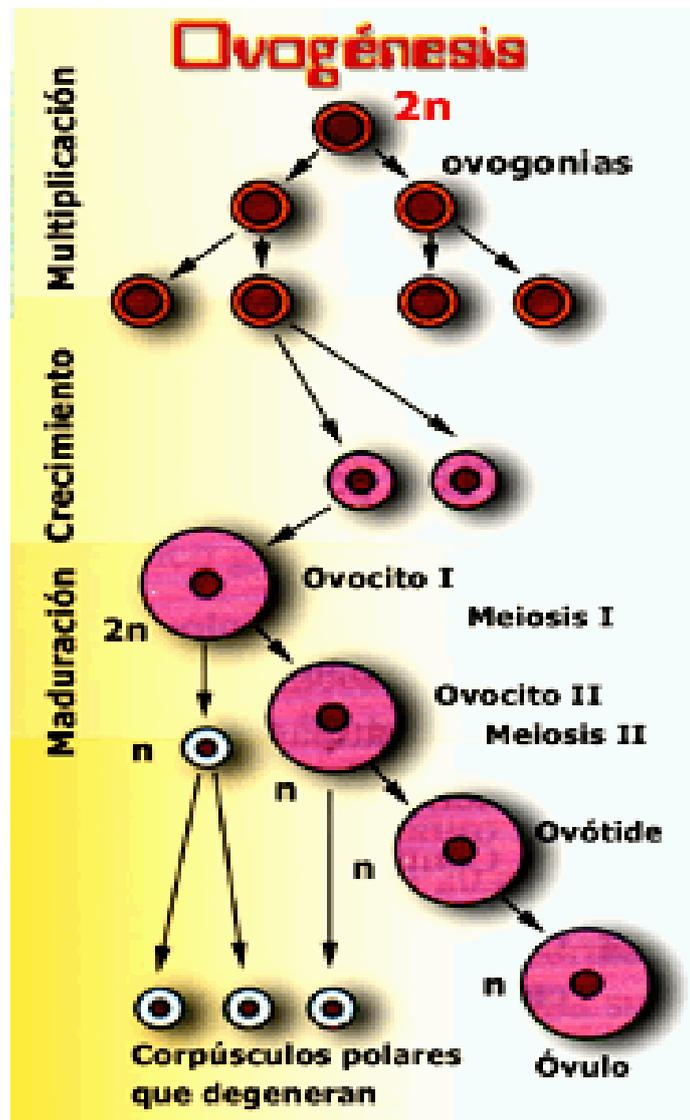


Fig. 2 Transformación de ovogonias a ovocitos: Ovogénesis



1.1 Etapa de gónada indiferenciada

Hacia el final de la **3ª semana** de gestación ya es posible identificar, en el endodermo primitivo, las *células germinales* que más tarde, y como consecuencia del propio movimiento y del crecimiento embrionario, se desplazarán hasta su localización gonadal primitiva. En la **6ª semana**, las células empiezan a proliferar por *mitosis* hasta llegar a unas 10.000.

1.2 Etapa de diferenciación

Entre la **6ª y 8ª semana**, la gónada se diferencia en sentido femenino y las células germinales dan lugar a las *ovogonias*. Los primeros signos de diferenciación ovárica se manifiestan con una rápida multiplicación mitótica de las células germinales, alcanzando un número que oscila de entre 6 a 8 millones en la 16ª – 20ª semana de gestación.

1.3 Etapa de multiplicación de ovogonias y formación del ovocito

Las ovogonias se transforman en ovocitos con la primera división meiótica que se detiene en la profase I.

El desarrollo posterior del ovocito queda detenido hasta la pubertad, momento en el que encontramos de 300.000 – 500.000, de los que sólo 400 – 500 serán los seleccionados para alcanzar la ovulación. En estos ovocitos, la **meiosis I** se completa dando lugar al primer corpúsculo polar y al ovocito de segundo orden. Justo después se inicia la **meiosis II** que se detiene antes de la ovulación en metafase.

Durante la gestación se produce una pérdida significativa del contenido de células germinales, no llegando todas a convertirse en ovocitos, razón por la que en el nacimiento su número oscila sólo entre 1 – 2 millones (Fig.2).



1.4 Etapa de formación del folículo

En la **18^a – 20^a semana** de gestación, la corteza del ovario es invadida por canales vasculares procedentes de la zona medular del ovario, lo que indica la formación de folículos. Esos vasos facilitan la llegada de células de origen mesenquimal y epitelial que rodean al ovocito. El resultado es el folículo primordial, constituido por un ovocito en profase I de la meiosis, cubierto por una hilera de células de la granulosa y una membrana basal.



2. FASES DEL CICLO OVARICO

Se distinguen tres fases en el ciclo ovárico: Fase Folicular, Fase Ovulatoria y Fase Lútea (Fig. 3) (Williams CJ y Erickson GF 2012).



Fig. 3 Fases de ciclo ovárico



2.1 Fase Folicular

La fase folicular se inicia el día 1 al 14 del ciclo, dando como resultado el folículo maduro desde la fase primordial, pasando por la fase preantral y antral hasta llegar a la fase preovulatoria. Los folículos primordiales están constituidos por ovocitos inmaduros que deben completar su maduración (*Balash J y col. 1992*).

La concentración de la hormona folículo estimulante (FSH), es alta al inicio de esta fase estimulando a varios folículos primordiales, de los que uno de ellos crecerá, se desarrollará y será el destinado a ovular y el resto sufrirán un proceso de atresia, en paralelo con la bajada continua de la FSH durante el resto del ciclo.

2.1.1 Folículo primordial.

Inicia el ciclo y está formado por un ovocito en estado de diplotene de la profase I de la meiosis, y una única capa de células de la granulosa con aspecto escamoso. El número de folículos primordiales que crecen cada ciclo parece ser dependiente de un “pool” residual de folículos inactivos. Se cree que el folículo destinado a crecer es seleccionado desde los primeros días del ciclo y es rescatado por la acción de la FSH, (*Balash J y col. 1992; Gougeon A 1996*).

2.1.2 Folículo preantral.

También llamado *folículo primario*, contiene un ovocito que ha aumentado de tamaño, seguido de la transformación de las células de la granulosa a forma cuboidal y de la multiplicación de esas células que empiezan a formar varias capas alrededor del ovocito. En este estadio aparecen, en las células de la granulosa de algunos de los folículos preantrales, los receptores a la hormona FSH. Este momento marca el inicio de la fase hormono-dependiente de la foliculogénesis. El folículo con más receptores para la FSH empieza a crecer antes de los demás y produce la hormona inhibina B que, en su turno, inhibe la secreción de la FSH y así frena el crecimiento hormono-dependiente de los demás folículos preantrales, lo que posteriormente llevará a su degeneración (atresia) (*Shander D y col. 1980*). Este mecanismo es responsable del fenómeno de la reciente “dominancia” del



folículo el más avanzado y de la ovulación generalmente monoovular en las mujeres (McGee EA y Hsuch AJ 2000; Richards JS 2001).

A nivel celular, en respuesta al aumento de la FSH se forman puentes de unión entre las células de la granulosa y el ovocito que permiten el paso de nutrientes (*gap junctions*). El ovocito es rodeado por la zona pelúcida. La capa de granulosa sufre un proceso de multiplicación de las células que pasan a tener una disposición multicapas, quedando separadas del estroma por la lámina basal. El folículo adquiere un mayor tamaño y pasa de la zona cortical del ovario a la zona medular, con una mayor vascularización y donde las células que rodean a la membrana basal se diferencian en capas concéntricas, la teca interna y la externa. Este crecimiento y diferenciación es dependiente de las gonadotropinas que tienen un efecto directo sobre la esteroidogénesis, (Gougeon A 1996).

Las células de la granulosa producen fundamentalmente estrógenos, aunque también son capaces de producir andrógenos y progesterona. La producción de estrógenos, emplea un sistema de dos tipos de células. La primera fase consiste en la formación de andrógenos a partir de colesterol en las células de la teca interna. La segunda fase, la propia producción de estrógenos, depende de la llegada de andrógenos sintetizados en la teca interna a través de la lámina basal, (Kobayashi M y col. 1990). (Fig.4).



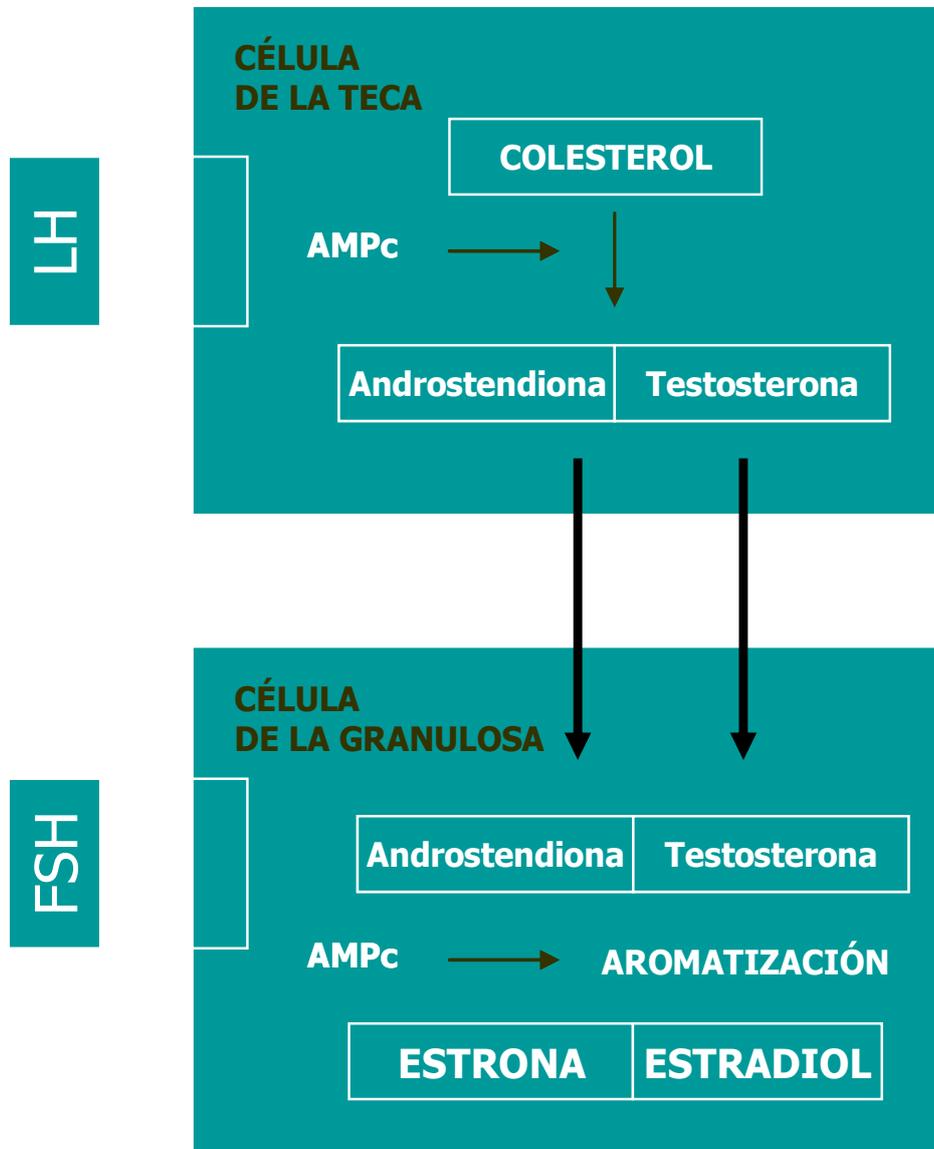


Fig. 4 Producción de estrógenos



Dentro de las células de la granulosa, los estrógenos sufren aromatización activada por la FSH, cuya unión con el receptor produce la activación del sistema adenilato ciclasa (AC) que es seguida de la expresión de múltiples ARNm que codifican las proteínas responsables de la proliferación, diferenciación y función de las células, sobre todo de la enzima aromatasa que convierte los andrógenos en los estrógenos. La misma FSH aumenta y disminuye la concentración de sus propios receptores en las células de la granulosa, acción modulada por factores de crecimiento.

Las células de la teca y de la granulosa actúan de forma sincronizada y reguladas por las gonadotropinas. En los folículos, las células de la teca son las únicas que expresan receptores de la hormona luteinizante (LH) desde el inicio de la fase hormonodependiente de la foliculogénesis, mientras que las de la granulosa expresan receptores para la FSH. La LH estimularía en la teca la producción de andrógenos a partir del colesterol, mientras que la FSH estimularía la producción de estrógenos a partir de andrógenos. Este sistema no es completamente funcional hasta etapas posteriores, (*Kobayashi M y col. 1990*).

2.1.3 Folículo antral.

El desarrollo folicular prosigue con la acción conjunta de los estrógenos y la FSH. Se produce una acumulación de líquido entre las células de la granulosa hasta formarse un auténtica cavidad, llamada *antro folicular*. El líquido folicular crea un medio endocrino para la nutrición del ovocito y de las células de la granulosa. El ovocito se sitúa de forma excéntrica rodeado por varias capas de células de la granulosa llamado *cumulus oophorus*. El desarrollo final del folículo ocurre cuando alcanza un tamaño de unos 20 mm de diámetro (*McGee EA y Hsuch AJ 2000*).

2.1.4 Folículo preovulatorio.

Consta de células de la granulosa que aumentan su tamaño y se rellenan de inclusiones lipídicas. En la teca aparecen vacuolas y gran cantidad de vasos sanguíneos. En este punto se alcanzan las tasas más altas de síntesis de estrógenos, alcanzando su pico más alto 24-36 horas antes de la ovulación. Estos altos niveles de estradiol desencadenan el pico de LH.



La FSH induce, en las células de la granulosa, la aparición de receptores de LH y la producción de esteroides, que aumentan bruscamente en la mitad del ciclo produciendo un efecto de retroalimentación positiva y desencadenando el pico de LH (*Fritz MA y col. 1992*). La LH promueve la luteinización de las células de la granulosa, lo que hace que se produzca progesterona.

La progesterona, cuando hay una preparación previa con estrógenos, facilita la retroalimentación positiva por activación sobre la hipófisis. De igual forma, la progesterona es la responsable en gran medida del pico de FSH que acompaña al de LH en la ovulación. Este pico contribuye a la expulsión del ovocito e induce la formación de un número adecuado de receptores en las células de la granulosa.

Los primeros cambios en el desarrollo folicular, desde el folículo primordial hasta que inicia su estado activo y comienza su desarrollo, son independientes de la estimulación gonadotropa. Sin embargo, en la etapa antral el folículo se vuelve extraordinariamente sensible y dependiente de la acción de las gonadotropinas.

De forma cíclica, muchos folículos abandonan su fase de reposo pero sólo uno madurará y establecerá la atresia de los demás. Este sistema cíclico se divide en 3 fases: reclutamiento, selección y dominancia.



2.2 Sistema cíclico de la fase folicular

2.2.1 Reclutamiento.

Este proceso comienza al final de la fase lútea del ciclo ovárico anterior, y continúa hasta el 5° – 7° día del ciclo ovárico en análisis.

Después, durante la mayor parte del ciclo menstrual normal, las concentraciones de gonadotropinas se mantienen bajas para estimular el desarrollo monofolicular.

Cuando no hay concepción las concentraciones de estradiol y progesterona disminuyen, lo que produce un efecto de retroalimentación sobre el eje hipotálamo - hipófisis y una elevación transitoria de las gonadotropinas que favorece la activación de algunos folículos (*Di Zerega GS y Hodgen GD 1981*), cuyo grupo se denomina **cohorte**.

2.2.2 Selección.

Sólo un folículo logrará ovular. Su selección sucede entre los días 5° – 7° del ciclo ovárico y pone fin a la fase de reclutamiento. Este proceso resulta de dos acciones estrogénicas: la interacción de estrógeno-FSH dentro del folículo, y el efecto de los estrógenos sobre la secreción hipofisaria de FSH, (*Fritz MA y col. 1992*).

Los estrógenos inciden sobre el folículo en un doble sentido: positivamente sobre el folículo en vías de maduración y negativamente sobre la hipófisis, produciendo una retroalimentación negativa que retira el apoyo gonadotropo a los demás folículos que se atresian.

Los elementos que determinan que el folículo dominante siga desarrollándose pese a los niveles bajos de FSH y escape a la supresión gonadotropa son los siguientes:

- De un lado la mayor vascularización que presenta el folículo dominante.
- De otro, la mayor cantidad de receptores de la FSH derivada del mayor desarrollo de la capa de células de la granulosa (*Suzuki T y col. 1998*), lo que provoca una acumulación mayor de estrógenos.



- También interviene la aparición de receptores de LH en las células de granulosa, así que LH puede sustituir parcialmente a FSH para promover el desarrollo folicular (*Filicori M y col. 2003*).

2.2.3 Dominancia.

Es el crecimiento folicular que precede a la ovulación. El folículo dominante controla su crecimiento, el medio endocrino, las vías reproductoras y el eje hipotálamo-hipófisis para la ovulación.

2.3 Fase ovulatoria

Desde el punto de vista morfológico, la ovulación se caracteriza por la aceleración del crecimiento del folículo, que se va aproximando a la zona cortical del ovario. Las células de la granulosa presentan un aumento de volumen y abundantes vacuolas lipídicas, mientras que la teca tiene un aspecto muy vascularizado.

Justo antes de la rotura folicular, en el polo más cercano a la parte más superficial del ovario se produce una mayor vascularización que protruye la superficie del folículo. Este es el punto de rotura (*Adashi AY 1997*). La expulsión del líquido folicular es lenta y progresiva. La liberación del ovocito tiene dos hipótesis:

- Los cambios en la composición del líquido folicular provocados por la variación del contenido hormonal y la presión osmótica.
- La síntesis de sustancias proteolíticas que digieren el colágeno de la pared folicular.

Desde el punto de vista endocrino, el propio folículo es el que desencadena la ovulación a través de una síntesis creciente de estradiol. Cuando el estradiol alcanza determinados niveles, produce un efecto de retroalimentación que estimula la segregación de gonadotropinas hasta llegar al pico de ovulatorio característico. La ovulación ocurre entre las 10-12 horas después del pico de LH; unas 34-36 (generalmente se supone que esto ocurre unas 38 h después del comienzo del pico) horas desde el comienzo del pico responsable último de la ovulación (*Balash J y Fabregues F 2002; Vanegas H 1995*).



El pico de LH (*Soede NM y col. 1994*) es el responsable de:

- La reanudación de la meiosis en el ovocito.
- La luteinización de las células de la granulosa.
- La estimulación de la actividad proteolítica y la síntesis de prostanglandinas para la rotura del folículo.

El pico de FSH (*Taya K y col. 1991*) es el responsable de:

- El aumento de la producción de plasminógeno.
- La secreción de ácido hialurónico por parte de las células del cúmulus para facilitar la expansión y dispersión de las células del cúmulus y que éstas floten libremente en el líquido folicular antes de la rotura.
- Garantizar un número adecuado de receptores de LH en la granulosa para facilitar una función lútea adecuada.

2.4 Fase lútea

Durante la fase lútea, y una vez expulsado el ovocito, se producen una serie de cambios en el folículo tanto desde el punto de vista morfológico como endocrino. Ya antes de terminar la ovulación las células de la granulosa empiezan a aumentar de tamaño y a tener una apariencia vacuolar con depósito de pigmento amarillo (luteína).

También proliferan los fibroblastos y capilares sanguíneos, lo que permite la llegada de sustratos necesarios para la síntesis hormonal al cuerpo lúteo, fundamentalmente para que el colesterol llegue a las células de la granulosa en cantidad suficiente para sintetizar progesterona.

El cuerpo lúteo es fuente principal de esteroides sexuales después de la ovulación. En ausencia de embarazo su capacidad funcional y vida media depende de la secreción de LH, mientras que con embarazo su mantenimiento dependerá de la hormona gonadotrófica coriónica (*hCG*). En ausencia de embarazo la vida media del cuerpo lúteo es de dos



semanas, tras las cuales se produce una regresión y se convierte en cuerpo *albicans*. La fase lútea debe durar, si todo el desarrollo folicular y hormonal ha sido normal, entre 11 y 17 días (*Lenton EA y col. 1984*).

Existen casos de mujeres donde se ha observado una deficiencia de la fase lútea (DFL) causada por una función alterada del cuerpo lúteo (CL) resultante de una anormal producción de estradiol y progesterona y acortamiento de la fase lútea, que puede originar un sangrado menstrual irregular (*Fritz MA 2012; Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine 2012*), infertilidad y pérdida temprana del embarazo (*Ginsburg KA 1992*).

El conocimiento de un criterio válido para el diagnóstico de la deficiencia de la fase lútea, es aún una cuestión a debate. La determinación de progesterona sérica en la fase lútea, como diagnóstico de la DFL, es una herramienta útil aunque no perfecta, ya que la liberación de progesterona del CL tiene un carácter pulsátil reflejando la liberación pulsátil de LH de la pituitaria (*Ginsburg KA 1992*).

Sin embargo, niveles de progesterona sérica por debajo de 10 ng / ml (31.8 nmol / ml), medidos en la mitad de la fase lútea, se considera como un indicador relativamente fiable de DFL (*Filicori M y col. 1984*). En estudios realizados por nuestro equipo, consideramos que el nivel bajo de progesterona en suero es clínicamente relevante cuando se asocia con un fallo inexplicable de la FIV.

Se observa que los tratamientos de infertilidad mediante fertilización in vitro (FIV) aumentan el riesgo de DFL, a pesar del desarrollo de múltiples folículos preovulatorios, al perder cada folículo una parte de sus células de la granulosa, durante la aspiración de los ovocitos, con el consiguiente empobrecimiento de la CL resultante (*Filicori M y col. 1984*). Por lo tanto, se suelen utilizar diferentes pautas de tratamiento como soporte de la fase lútea, con gonadotropina coriónica humana (hCG), estradiol o progesterona, durante algún tiempo, después de la transferencia de los embriones (*Jordan J y col. 1994; Garcia J y col. 1981*).



El efecto beneficioso del agonista de GnRH como agente de soporte de la fase lútea se demostró por primera vez en 2004 (*Tesarik J y col. 2004*). Desde que se administró agonistas de la GnRH a mujeres con ovulación bloqueada que recibieron embriones resultantes de ovocitos donados, se concluyó que el agonista de GnRH ejerce un efecto directo sobre los embriones implantados (*Tesarik J y col. 2006*). Sin embargo, estudios adicionales mostraron un efecto beneficioso similar del agonista luteal de GnRH en ambos tipos de protocolos utilizados actualmente en ciclos de estimulación ovárica controlados por agonistas y antagonistas, respectivamente (*Pirard C y col. 2015; Bar-Hava I y col. 2016*), lo que sugiere que el agonista de GnRH puede también ejercer un efecto directo sobre la función del CL. Este supuesto fue corroborado por la observación de que el agonista de GnRH puede rescatar la función del CL en ciclos de estimulación ovárica controlados por antagonistas de GnRH y desencadenados con agonistas de GnRH (*Leth-Moyer K y col. 2014*). Estos protocolos de estimulación ovárica disminuyen la probabilidad de hiperestimulación en mujeres con un alto riesgo pero sin un soporte adecuado de la fase lútea producen un efecto luteolítico que reduce significativamente las tasas de embarazo (*Bar-Hava I y col. 2016*).

Sobre la base de las observaciones anteriores, se ha planteado la hipótesis de que el soporte de la fase lútea con el agonista de GnRH puede ser de ayuda para todas las mujeres tratadas por reproducción asistida que muestran niveles bajos de progesterona en suero en la fase lútea, e incluso en aquellos con deficiencia de CL en los ciclos de concepción natural (*Tesarik J y col. 2016*). En nuestro programa de fecundación in vitro, la determinación de la concentración de progesterona sérica se realiza en todas las mujeres a los 7 días y 14 días, tras la transferencia de los embriones. Algunas pacientes muestran niveles de progesterona anormalmente bajos en estos días, a pesar de altas dosis de progesterona administrada por vía vaginal, y la mayoría de ellas no logran alcanzar el embarazo.

Una vez estudiado el ciclo ovárico completo, desde su comienzo de desarrollo en el feto, el breve periodo de letargo en la infancia y el resurgir en la pubertad, donde comienza el tiempo fértil de la mujer, vamos a analizar su gran importancia en reproducción asistida.



Anteriormente hemos hablado de que una vez diagnosticada la pareja infértil se procede a realizar un tratamiento personalizado de la misma que, para la mujer, irá destinado a la estimulación ovárica con el fin de poder obtener un número adecuado de ovocitos de buena calidad.



3. ESTIMULACION OVARICA

Una óptima estimulación ovárica es una parte esencial de la reproducción asistida. En la gran mayoría de los centros, el primer tipo de protocolo a seguir es el coito programado con o sin estimulación ovárica, pero si este protocolo falla, o no es adecuado debido a diferentes anomalías del sistema reproductor masculino o femenino, se realizará la inseminación artificial ya sea con semen de la propia pareja o de donante. La expectativa es de conseguir un folículo maduro y por lo tanto un óvulo maduro, aunque en muchas ocasiones resultan embarazos múltiples, debido a la ovulación bifolicular o multifolicular.

En el caso de que estos procesos no sean los idóneos se puede recurrir a la fecundación in vitro donde se va a proceder a una estimulación ovárica algo más fuerte con el fin de proporcionar un desarrollo folicular múltiple (Fig. 5), obtener un mayor número de ovocitos maduros y así aumentar las posibilidades de embarazo. (*Oehninger S y Hodgen GD 1990; Fauser D y Devroey P 2003*).



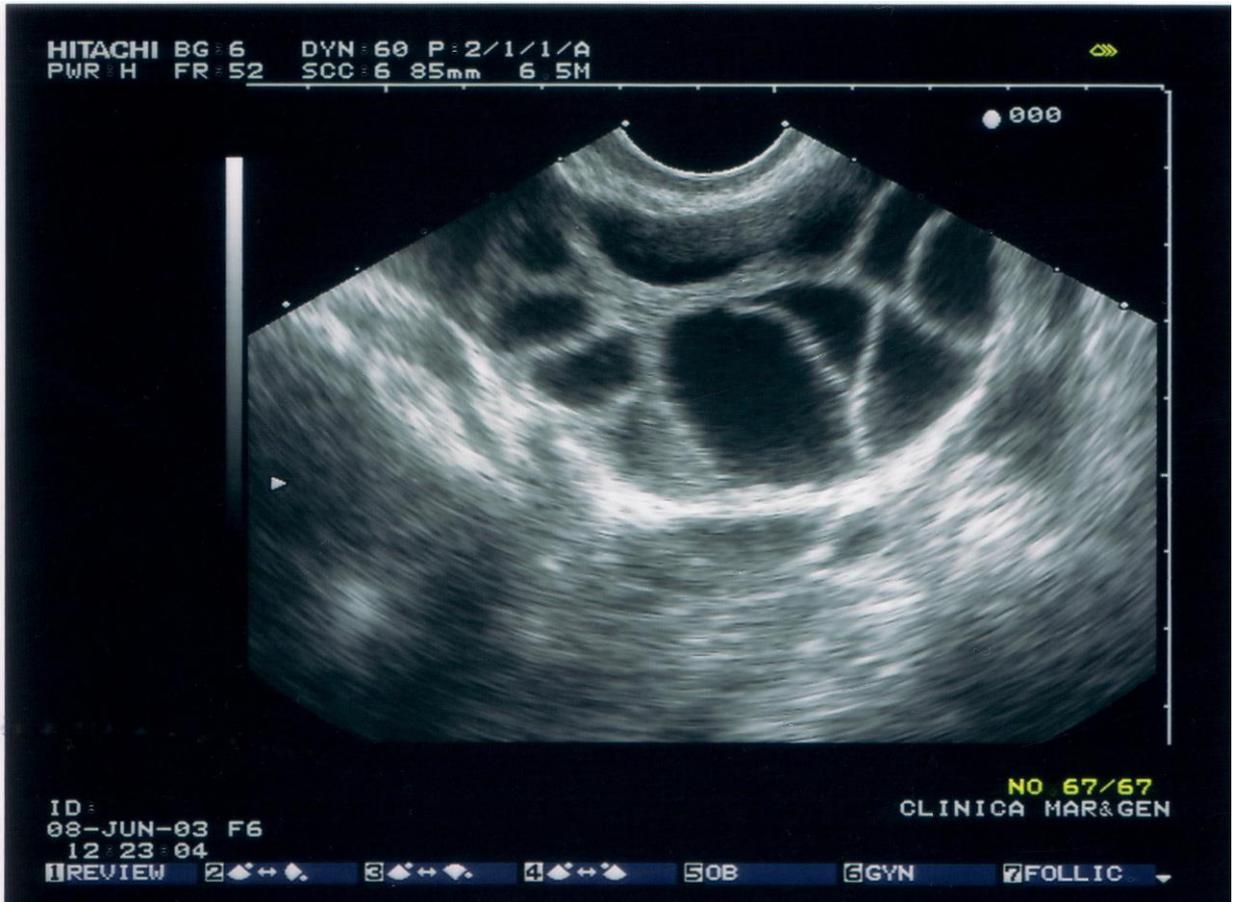


Fig. 5 Crecimiento de múltiples folículos antrales en el ovario como consecuencia de la estimulación ovárica



3.1 Selección de las pautas de tratamiento

Aunque varias clínicas practican protocolos de estimulación más o menos uniformizados, en nuestra clínica se elaboran protocolos de estimulación totalmente individualizados, teniendo en cuenta edad de la paciente, reserva ovárica, endocrinología y tipo de tratamiento biomédico (coito programado, inseminación artificial, fecundación in vitro, ovodonación...), siempre intentando reducir al máximo los riesgos e intentando obtener el mayor número posible de ovocitos maduros, embriones de buena calidad, y por supuesto gestación a término.

Antes de disponer de un tratamiento adecuado se debe catalogar a la paciente como, normo-, híper- o hipo-respondedora. Existen varias pruebas a determinar como FSH, LH y 17 beta-estradiol (entre los 3 primeros días del ciclo). La hormona antimulleriana (AMH), secretada por las células de la granulosa de los folículos preantrales y antrales pequeños, parece ser, junto con el recuento de pequeños folículos antrales en ambos ovarios en los primeros días del ciclo menstrual, el marcador más fiable de la reserva ovárica. A diferencia de las otras 3 hormonas, que varían a lo largo del ciclo menstrual, La AMH queda inalterada, por lo que puede hacerse la determinación en cualquier momento del ciclo en estudio (*Feyenisen A y col. 2006*). Según algunos autores la edad de la mujer es otro parámetro con gran valor predictivo del éxito del ciclo (*Hendricks D y col. 2005*).

Las pacientes **normo-respondedoras**: son aquellas cuya valoración clínica, endocrinológica y ecográfica nos muestran valores normales. En regla general, su tipo de tratamiento para la estimulación ovárica será fundado en la combinación personalizada de preparaciones con la actividad de FSH y LH en un protocolo largo con agonista de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) o con un antagonista de GnRH (para reducir el coste del tratamiento). La dosis de FSH y LH podría ser fija durante los primeros días de la estimulación pero se tiene que adaptar posteriormente a la respuesta individual de los ovarios de cada paciente determinada mediante varios controles durante el tratamiento.



Las pacientes con **baja respuesta**: son aquellas que no responden lo suficientemente a la estimulación convencional. En ocasiones tienen los niveles hormonales basales alterados, pero en otras, la respuesta es inesperada y ocurre después de un intento fallido. Algunos autores consideran un desarrollo folicular mínimo aquel que garantiza un número de cuatro ovocitos y por lo menos 2 embriones viables para transferir (*Bancsi LF y col. 2002; Klinkert ER y col. 2004*). Los protocolos a utilizar en estos casos no están bien definidos, aunque la mayoría exige el uso de protocolos cortos con agonistas de GnRH (“flare-up”) o protocolos utilizando antagonistas de GnRH y aumentando las dosis de gonadotropinas.

Las pacientes **hiper-responderas**: son aquellas en las que se hace más importante la prevención de complicaciones resultantes de una estimulación demasiado fuerte (síndrome de hiperestimulación ovárica). En líneas generales se trata de pacientes que necesitan la utilización de dosis más bajas de gonadotropinas al inicio de la estimulación. En caso de una amenaza seria de la hiperestimulación se pueden utilizar métodos alternativos de la desencadenación de la ovulación, interrumpir la estimulación durante algún día o criopreservar todos los embriones evitando su transferencia en ese ciclo.



4. GONADOTROPINAS

Son hormonas sintetizadas por la glándula pituitaria o por la placenta durante el embarazo. Las preparaciones de gonadotropinas utilizadas para la estimulación ovárica se utilizan preparaciones de gonadotropinas aisladas y purificadas a partir de la orina de mujeres postmenopáusicas o bien sintetizadas de forma recombinante, siendo esta última la más novedosa. La diferencia entre las preparaciones disponibles en el mercado reside en el contenido proteínico, ajeno a la hormona. Entre las procedentes de la orina, según la cantidad de estas proteínas contaminantes, se distinguen preparaciones purificadas o altamente purificadas. Las recombinantes no tienen ese contenido proteínico ajeno. La ventaja más importante de las altamente purificadas y las recombinantes es su fácil manejo por la paciente pues las inyecciones son subcutáneas, mientras que las purificadas que son por inyección intramusculares.

Antes de fijar los parámetros para una buena inducción ovárica debemos recordar la importancia del papel de la FSH y LH.

4.1 Papel de la FSH

El crecimiento folicular depende de la acción tónica de la FSH hasta que el folículo alcanza un diámetro de unos 5mm. Los folículos que alcanzan este estadio se pueden considerar en disposición de entrar en la fase final de maduración.

Una vez se inicia la involución del cuerpo lúteo se produce la disminución de la producción de estrógenos, progesterona e inhibina, mientras que en el ciclo menstrual humano, los niveles de FSH se elevan al final de la fase lútea. Esta elevación se denomina interciclo de la FSH y esta sincronizada con la ovulación, produciéndose el aumento interciclo 12 días después del pico de LH (*Hall JE y col. 2000*).



La elevación de la FSH interciclo está íntimamente relacionada con la capacidad de reclutamiento folicular. Por ello podemos incluir dos nuevos conceptos: “umbral de FSH” que sería aquel nivel plasmático de FSH capaz de iniciar el reclutamiento. Y “ventana FSH” que se refiere al número de días que los niveles de FSH se mantienen por encima del nivel del umbral citado.

4.2 Papel de la LH

La exposición tónica a la LH promueve la capacidad de respuesta folicular a la FSH durante el reclutamiento y selección folicular. La LH promueve la síntesis de andrógenos a nivel de la teca del folículo seleccionado, que sirven de sustrato para sintetizar los estrógenos a nivel de las células de la granulosa y así permitir un descenso en los niveles de FSH, que provoca la atresia de los folículos no seleccionados. La LH es también fundamental en la segunda mitad de la fase folicular, para la maduración folicular y ovocitaria. No obstante, los folículos expuestos a altos niveles de LH en la fase folicular avanzada entran en atresia o se luteinizan prematuramente (*Hillier SG 1993*). Por ello, debemos pensar que los folículos tienen unas necesidades específicas de LH por encima de las cuales cesa su desarrollo normal, esto es conocido como “techo de la LH”.

4.3 Factores que influyen en la estimulación óptima

Es de aceptación general que para obtener una buena estimulación hay que tener en cuenta:

4.3.1 Aumento y extensión del crecimiento interciclo de la FSH en la fase inicial de la estimulación y bloqueo hipofisario en la fase final de la estimulación.

En el año 1971 *Schally AV y col.* aislaron y determinaron la estructura del GnRH. Es un decapeptido secretado por el hipotálamo y que, liberado de forma intermitente, estimula la síntesis y secreción de FSH y LH. Reemplazando uno o dos aminoácidos de su estructura se consiguen los análogos agonistas de la GnRH, que si se administran de forma continuada provocan un inicial aumento de los niveles plasmáticos de FSH y LH y que de forma posterior consiguen una desensibilización hipofisaria debido a la ocupación masiva e internalización de los receptores hipofisarios de la GnRH (*Guillemin R y col. 1971*).



Otras modificaciones de la GnRH han permitido obtener los análogos antagonistas de la GnRH. Estos, a diferencia de los agonistas, provocan un bloqueo inmediato de los receptores de la GnRH, que dan como resultado una inhibición rápida y reversible de la inhibición de las gonadotropinas (*Fausser B y Devroey P 2005*). La utilización, primero de los agonistas y después de los antagonistas de la GnRH, ha reducido casi completamente la ovulación y luteinización prematura.

Los análogos agonistas de la GnRH se pueden utilizar con dos pautas diferentes:

- **Protocolo largo**, que comienza el análogo en fase lútea media del ciclo precedente al de la estimulación y manteniéndolo hasta la administración de la hCG. La administración del análogo dura 1-2 semanas y de esta manera se inicia la estimulación con gonadotropinas una vez se ha conseguido la quiescencia folicular.
- **Protocolo corto**, que consiste en comenzar con el análogo en la fase menstrual e iniciar la estimulación con gonadotropinas inmediatamente después, aprovechando el incremento de la FSH y LH provocado al inicio del tratamiento con el agonista.

Se ha podido demostrar que el protocolo largo da mejores resultados a nivel de la calidad de ovocitos y de gestaciones, aunque es necesario el uso de mayor cantidad de gonadotropinas (*Daya S 2000*).

Los análogos antagonistas se utilizan con el objeto fundamental de realizar protocolos más cortos, ya que se administran cuando la estimulación gonadotrófica ya se ha iniciado y su único fin es el de impedir los picos de LH que provocan la luteinización.

Los antagonistas se utilizan como pauta única (3 mg de ganirelix o cetrorelix) entre el 8º y 9º día de la estimulación (*Olivennes F y col. 1998*) o como pautas múltiples (0,25 mg/día) a iniciar el 6º día de estimulación y manteniéndolo hasta el día de la HCG. Hay dos formas de usar el análogo antagonista con dosis múltiples, la que inicia en el día 6º y la que se demora a la aparición del primer folículo de 14 mm.



4.3.2 Superación del valor “umbral” y del periodo “ventana” de FSH.

El nivel de FSH interciclo es el que establece el reclutamiento del número de folículos que conformaran la cohorte (entre 10 - 20 folículos y entre 2 – 5mm). La selección y dominancia de uno de ellos es debida a una mayor sensibilidad de las células de la granulosa a la FSH y la síntesis de estradiol en este folículo es el responsable de la atresia del resto. El desarrollo folicular está más relacionado con el tiempo de exposición a la FSH (ventana) que con la dosis utilizada (umbral). Por tanto el reclutamiento folicular múltiple es proporcional al acumulo de FSH independientemente de los niveles plasmáticos con seguidos con niveles iniciales elevados (*Fauser BC y col. 1993; Fauser BC 1994*).

Las dosis iniciales de gonadotropinas varían entre 100 y 300 UI/d y son ajustadas, de forma individual, a las pacientes. No se ha demostrado que dosis más altas den mejores resultados, incluso en mujeres de edad avanzada, ya que el tratamiento gonadotrófico solo actúa en los folículos de la cohorte, no promueven el desarrollo de nuevos.

Los diferentes estudios no dan evidencias suficientes para pensar que la FSH recombinante tenga mejores resultados a nivel de gestaciones que la FSH urinaria o la HMG (*Al Inany H y col. 2003*). Pero el uso de la recombinante es más seguro, tiene una mayor tolerancia (*Albano C y col. 1996*) y un riesgo menor de la transmisión de priones (*Shaked GM y col. 2001*).



4.3.3 Mantenimiento de los niveles plasmáticos adecuados de LH.

Los niveles de LH deben mantenerse dentro de unos límites que cuando no se alcanzan o se superan provocan problemas trascendentes para el ciclo.

Existe un gran debate de la conveniencia de utilizar o no preparaciones con actividad LH. Se ha publicado que una excesiva supresión podría ser nociva para la posibilidad de gestación como para su continuidad (*Westergaard LG y col. 2000; Fleming R y col. 2000*). Pero niveles inferiores a 0,5 UI/L en la fase folicular media podría acompañar resultados peores. Otros estudios argumentan que los niveles de LH no influyen en los resultados del ciclo (*Peñarrubia J y col. 2003; Merviel P y col. 2004*) y solamente el nivel de supresión hipofisiaria, sobre todo con preparados de absorción retardada, podría acompañarse de niveles más bajos de LH, cuando de utilizan preparados de FSH, lo que aumentaría la duración del ciclo pero que no influye en los resultados (*Balash J y col. 2003*). Los criterios de la utilidad de la actividad LH durante la estimulación depende de los valores actuales de LH en el suero, del ritmo de crecimiento de diferentes folículos en respuesta a la estimulación (*Tesarik J y Mendoza C 2002*) y del fin que queremos alcanzar (desarrollo mono- o paucifolicular en casos de inseminación intrauterina versus el desarrollo del mayor número de folículos posible en casos de la FIV).



5. HORMONA DE CRECIMIENTO

La hormona de crecimiento (GH) o somatotropina es una hormona peptídica segregada por la pituitaria, que originariamente, estimula el crecimiento, reproducción celular y la regeneración en humanos y otros animales, aunque se ha podido comprobar que es una hormona muy compleja que puede estar implicada en otras muchas funciones que aún se desconocen (*Powers M 2005*).

El ciclo folicular de los primates depende en gran manera de factores autocrinos/paracrinos. Debido al papel crítico del factor de crecimiento tipo insulina I (IGF-I) rápidamente se vio que añadir GH, que estimula la producción de este factor, (habitualmente en dosis de 24 UI por vía intramuscular administrada en días alternos), podía facilitar la inducción de la ovulación con gonadotropinas en pacientes malas respondedoras o con ovarios poliquísticos, aunque la GH puede afectar el desarrollo folicular mediante sus receptores específicos presentes en el ovario, independiente del IGF-I (*Tesarik J y col. 2005*).

Los primeros análisis dieron buenos resultados, pero se limitan a mujeres con ovarios poliquísticos (*Ibrahim Z y col. 1991; Owen EJ y col. 1991*). En mujeres de respuesta normal ni mejoraban la respuesta ni disminuían la cantidad de gonadotropinas (*Hughes SM y col. 1992*). En ellas la GH y la IGF-I están operando al máximo rendimiento.

En las mujeres bajo respondedoras, es decir que no producen suficientes folículos en sus ovarios, el tratamiento con GH puede disminuir el uso de las gonadotropinas, acortar el tratamiento y aumentar las posibilidades de éxito (*Levy T y col. 1993*). Algunos autores no han encontrado pruebas de que la GH ayude a mejorar las tasas de natalidad en mujeres con buena respuesta a la FIV. Sin embargo, existen algunas pruebas de un aumento en las tasas de embarazo y natalidad en mujeres con antecedentes de respuesta deficiente a la FIV. Dichos resultados fueron apenas significativos ya que se obtuvieron en tres ensayos con un número pequeño de pacientes (*Harper K y col. 2003*).



6. MODELO DE PROTOCOLO DE ESTIMULACIÓN OVÁRICA

Han sido muchos y variados los protocolos de estimulación ovárica desde que en el 1978 tuviera éxito la FIV gracias a R Edwards y P Steptoe, en Manchester (Gran Bretaña), aunque este primer éxito fue alcanzado en un ciclo natural, sin ningún tipo de estimulación ovárica (*Steptoe PC y Edwards RG 1978*). La estimulación ovárica fue utilizada por la primera vez 17 años antes del primero éxito de FIV para facilitar la reproducción natural en mujeres con ciclos anovulatorios (*Greenblatt RB y col. 1961*).

Después del primer éxito de la FIV, se empezó rápidamente a extender el uso de la estimulación ovárica para estos tratamientos, siendo pioneros un grupo australiano: *Trounson AO y col. 1981* y un grupo británico: *Edwards RG y Steptoe PC 1983*). A lo largo de los más de 40 años de la evolución de la FIV, se han diseñado diferentes métodos de estimulación ovárica (*Tesarik J. 2017*) y la elección personalizada del método el más adecuado para cada caso concreto tiene una gran importancia para el éxito del tratamiento, sobre todo en los casos difíciles (*Mendoza-Tesarik R y Tesarik J 2018*).

En este trabajo, vamos a exponer uno de los que mayor éxito tiene y por ello el de mejor aplicación.

La estimulación ovárica se origina a los 7-14 días de la administración continuada de gonadotropinas. La variación en las dosis dependerá de los resultados del estradiol circulante y de la cantidad y tamaño de los folículos.

Según el tipo de la respuesta de cada paciente a la estimulación (normo-respondedoras, hipo-respondedoras o hiper-respondedoras), puede ser más útil empezar la estimulación con las dosis más altas de gonadotropinas y bajar progresivamente o al revés.

El clínico responsable tomará la decisión de la cantidad de medicación diaria con relación a las analíticas de estradiol circulante y las ecografías relativas al tamaño de los folículos. Cuando algunos de los folículos adquieren un tamaño similar a 16-18 mm, y la mayorías de los demás supera el tamaño de 12-15 mm, es el momento de administrar la



HCG, que provocará directamente la maduración de los ovocitos, o un bolo de agonista de GnRH que inducirá un pico de LH produciendo el mismo efecto. Unas 36 horas después de la administración de la HCG se procederá a la punción folicular, con el objeto de obtener los ovocitos maduros.

Determinaciones hormonales y controles ecográficos durante el protocolo de estimulación ovárica.

El nivel óptimo de estradiol al séptimo día de tratamiento estará entre 1000 -1500 pg/ml (*Haning RV y col. 1979*). El riesgo de hiperestimulación aumenta significativamente si el valor se encuentra entre 1500 – 2000 pg/ml y no se debe administrar mucho más medicación si supera este valor de 2000 pg/ml (*Haning RV y col. 1984*).

La evaluación mediante ecografía nos permite determinar el grado de maduración de los folículos (*Ritchie W 1985*), por lo que realizar varios controles a lo largo de la estimulación proporciona una mejor aproximación para ajustar el momento de la administración de la HCG.

Además del crecimiento folicular, las ecografías indican la modificación endometrial a lo largo del tratamiento. Las mejores tasas de embarazo muestran valores de entre 9-10 mm, con un mínimo de 7 mm, del grosor del endometrio.

La calidad de la estimulación se puede afinar incluyendo controles de LH. Si los niveles de LH son bajos (1.0 U/l), conviene añadir una preparación de HMG (de actividad LH) o de la LH recombinante a la FSH pura.



7. PUNCIÓN FOLICULAR Y RECOGIDA OVOCITARIA

La punción folicular consiste en la recuperación de los ovocitos, vía vaginal, mediante un sistema de aspiración guiada ecográficamente y bajo sedación (*Dellenbach P y col. 1985*).

La punción folicular deberá llevarse a cabo justo antes de que se produzca la ovulación y para poder planificarla, la ovulación se induce artificialmente mediante una inyección de HCG o del agonista de GnRH, aproximadamente 36 horas antes del tiempo previsto para la punción folicular que es cuando se supone que la mayoría de los ovocitos se encuentran maduros, en Metafase II (*Bosdou JK y col. 2015; Wei W y col. 2011*).

La calidad del ovocito es muy importante para obtener buenos resultados tanto de fecundación como de embarazo. Y en dicha calidad ovocitaria van a intervenir diferentes factores como puede ser la edad de la paciente, reserva ovárica, índice de masa corporal, la eventual presencia de diferentes enfermedades que afectan directamente o indirectamente a los ovarios (ej. Endometriosis, síndrome de ovario poliquístico, diabetes) y por supuesto el protocolo de estimulación.

Obtener un ovocito maduro y de óptima calidad es crucial para el éxito del protocolo. Hay muchas teorías sobre la relación entre calidad del ovocito y sus diferentes características morfológicas y se han establecido diferentes clasificaciones, teniendo en cuenta 3 características principales: la calidad del citoplasma, la calidad del exocitoplasma, y la calidad del complejo cúmulus-corona radiata-ovocito.



7.1 Calidad del citoplasma.

- Agrupaciones de orgánulos en el centro del ovocito: es una alteración frecuente que se observa en el microscopio óptico como una masa individual y oscura con excesivo contenido de gránulos, generalmente en la porción media del ovocito. (*Kahraman S y col. 2000; Meriano JS y col. 2001; Van Blerkom J y Henry G 1992*).
También se ha descrito la vesicularización de la totalidad del citoplasma (*Meriano JS y col. 2004; Van Blerkom J y Henry G 1992*).
- Agregación de retículo endoplasmático liso: es un tipo de inclusión citoplasmática elíptica y del tamaño de un pronúcleo resultado de una acumulación masiva de sáculos del retículo endoplasmático. (*Otsuki J y col. 2004*).
- Vacuolas: son inclusiones citoplasmáticas rodeadas de membrana y llenas de fluido. (*Otsuki J y col. 2004; Van Blerkom J 1990*).
- Inclusiones citoplasmáticas: son consideradas pequeñas zonas de necrosis compuestas de lípidos y gránulos densos que pueden agruparse o quedarse dispersos (*Serhal PF y col. 1997; Suzuki K y col. 2004*).

7.2 Calidad del extracitoplasma.

- Exudados en el espacio perivitelino: la presencia de esta granulación en el espacio perivitelino está relacionada con un deterioro de la zona pelúcida interna. Una gran cantidad puede suponer un descenso importante en la fecundidad (*Veeck LL 1999*), aunque otros estudios no han confirmado esta afirmación. La presencia de estos detritus puede ser signo de una “sobredosis” de las gonadotropinas utilizadas en las estimulaciones. Aunque su presencia no parece alterar la calidad embrionaria, fecundación, tasas de división o embarazo.... (*Hassan-Ali H y col. 1998*). Por tanto este fenómeno podría estar relacionado con la maduración fisiológica del ovocito (*Balaban B y Urman B 2006*).



- Anomalías de la zona pelúcida: la zona pelúcida pasa por diversas apariencias y grosores a lo largo de su desarrollo. Las anomalías más comunes son aquellas que transforman la zona pelúcida, con alteraciones de su forma circular y la formación de abultamientos y septos (*Sauerbrun-Cutler MT y col. 2015*).
- Espacio perivitelino aumentado: es una característica claramente visible y se observa como un espacio entre el citoplasma y la zona pelúcida muy dilatado, quedando el citoplasma como flotando. Es una característica asociada a una baja calidad ovocitaria (*Xia P 1997*).
- Alteraciones del primer corpúsculo polar: la morfología del primer corpúsculo polar varía dependiendo de la duración del cultivo del ovocito in vitro antes de ser fecundado (*Balaban B y col. 1998*). De hecho se ha detectado una correlación positiva entre el porcentaje de fragmentación y el tiempo transcurrido en la desnudación y la ICSI (*Ciotti PM y col. 2004*); así como también un incremento de la fragmentación del corpúsculo polar a lo largo del tiempo (*Verlinsky Y y col. 2003*). Algunos autores han sugerido que la morfología del corpúsculo polar está relacionada con las tasas de embarazo e implantación (*Ebner T y col. 1999, 2000, 2002*). La variación del tamaño del corpúsculo polar también es determinante en la calidad, pues está relacionada con la posición del huso meiótico en la periferia del ovocito. Ovocitos con un corpúsculo polar anormalmente pequeño o grande tienen más probabilidad de albergar diferentes alteraciones cromosómicas en comparación con los ovocitos con el corpúsculo polar de un tamaño normal (*Veeck LL 1999*).

7.3 Calidad del complejo cúmulus-corona radiata-ovocito

El grado de madurez del complejo ha sido utilizado como indicador de la madurez ovocitaria, aunque la sincronía entre ambos es cuestionable, sobre todo en ciclos estimulados (*Hartshorne G y col. 1999; Tarin JJ y Pellicer A 1992*).

Esto puede ser debido a diferencias de sensibilidad de las células del complejo cumulo-corona y del núcleo ovocitario, a la maduración inducida (*Balaban B y Urman B 2006*).



8. REPRODUCCION ASISTIDA

Se entiende por Reproducción Asistida (RA) al conjunto de técnicas y tratamientos a los que se somete a los pacientes para conseguir el fin de obtener una gestación evolutiva y el nacimiento posterior de un niño.

Se puede considerar tres grupos:

Existen diferentes técnicas de RA y las más empleadas son:

- **Inseminación artificial (IA):** que consiste en introducir la muestra de semen, una vez preparada, en el interior de la vagina o útero de la paciente.
- **Fecundación In Vitro:**

Fecundación in vitro convencional (FIVc), que trata de poner en contacto los ovocitos, obtenidos mediante punción folicular, con una concentración adecuada de espermatozoides, en un medio de cultivo.

Microinyección intracitoplásmica de espermatozoides (ICSI), es una técnica de RA similar a la FIVc, con la diferencia de que la inseminación de los óvulos se realiza al introducir un espermatozoide en el interior del óvulo mediante una microaguja.



9. CALIDAD EMBRIONARIA

La calidad del embrión depende de diferentes factores: calidad del ovocito, calidad del espermatozoide que lo ha fecundado, método utilizado para su fecundación, destreza del embriólogo en la práctica de la técnica utilizada, medio de cultivo utilizado y varios factores relacionados con el cultivo in vitro (estabilidad de la temperatura, composición y estabilidad de la fase gaseosa % CO² y % O², dentro del incubador, la pureza del aire en el laboratorio, la frecuencia de las observaciones de los embriones fuera del incubador y la duración de cada una etc.).

9.1 Día 1

El día después de la punción folicular se denomina **Día 1 (D+1)**. Es en este día, entre las 16-20 horas posteriores a la FIVc o a la ICSI, es cuando se observa si se ha producido o no fecundación. El embrión con fecundación normal consta de 2 Pronúcleos y 2 Corpúsculos polares (Fig. 6), observándose:



Fig. 6 Un ovocito fecundado (cigoto) con 2 pronúcleos, uno del origen ovocitario y el otro proveniente del espermatozoide



- **Número de corpúsculos polares:** en la fecundación normal el embrión tiene 2 corpúsculos polares.
- **Apariencia de los corpúsculos polares:** la apariencia de los corpúsculos polares hace referencia a su tamaño y fragmentación.
- **Número de pronúcleos:** la observación de los pronúcleos y los corpúsculos polares conjuntamente es la forma tradicional de decidir la buena morfología en D+1. La forma óptima es 2 corpúsculos polares de tamaño la mitad de un pronúcleo y sin fragmentaciones, y 2 pronúcleos de igual tamaño y unidos.
- **Apariencia de los pronúcleos:** hay dos ejemplos de gradación pronuclear en función de la apariencia y distribución de los pronucleolos. (*Tesarik J y Greco E 1999; Scott L 2000*). Otras características muy importantes son por ejemplo el número de pronúcleos: lo normal son 2, la disposición de los pronúcleos: juntos y el tamaño de los pronúcleos: iguales.
- **Halo citoplasmático:** es una zona cortical más clara en parte o en todo el citoplasma. Los autores coinciden en que es un rasgo positivo siempre que no sea excesivo. Los cigotos con halo darán embriones con mejor calidad (60,9%) mientras que los que no lo tienen darán embriones con una calidad peor (52,2%) (*Balaban B y Urman B 2006; Payne D y col. 1997; Salumets A y col. 2001; Zollner U y col. 2002*).
- **División temprana:** hay muchos estudios que analizan los embriones entre las 25 y 27 horas después de la ICSI, siempre combinando este parámetro junto con la morfología del cigoto (*Chen S y Kattera S 2006*), la mononucleación en D+2 (*Ciray HN y col. 2005*) o los parámetros de la morfología en D+3 (*Neuber E y col. 2003*). Estos estudios correlacionan esta división temprana con la morfología embrionaria en D+2 y D+3 (*Ciray HN y col. 2006; Lundin K y col. 2001*), con el desarrollo hasta blastocisto (*Neuber E y col. 2003*), con la viabilidad (*Salumets A y col. 2003; Shoukir Y y col. 1997*), con la tasa de implantación (*Ciray HN y col. 2006; Rienzi L y col. 2005*) o con la tasa de aborto (*Van Montfoort AP y col. 2004*). La conclusión general es que la división temprana debe utilizarse a la hora de decidir entre embriones de calidad aparentemente igual.



9.2 Día 2 y Día 3

El **Día 2 (D+2)** (Fig. 7) y el **Día 3 (D+3)** (Fig. 8) se refiere a las 44-47 horas y 67-71 horas, respectivamente, tras la punción. Aquí es donde se valoran los embriones normalmente a la hora de elegir el embrión a transferir. Aunque existe un consenso de lo que es un buen y un mal embrión, con los de calidad intermedia siempre hay multitud de opiniones. Los parámetros medidos en D+2 y D+3 son:



Fig. 7 Embrión a 4 células en día 2 de su desarrollo





Fig. 8 Embriones a 8 células en su día 3 de desarrollo



- **Número de células y ritmo de la división:** en una transferencia en D+2 los embriones de 4 células son los que tienen mejor pronóstico mientras que los de 2 ó 5, 3 ó 6 y 1 o más de 6 células serían de peor calidad. En D+3 el mejor embrión que podríamos transferir es de 8 células. (*Ziebe S y col. 1997; De Placido G y col. 2002; Van Royen E y col. 1999; Fish JD y col. 2001; Lavarge H y col. 2001; Munné S y Cohen J 1998*).
- **Porcentaje de fragmentación celular:** la presencia de algunos fragmentos no es indicativo de un pronóstico, hasta un 20% de fragmentación la implantación no está comprometida (*Hardarson T y col. 2001; Van Royen E y col. 1999; Ziebe S y col. 1997; Alikani M y col. 2000; Racowsky C y col. 2003*).
Es importante distinguir un blástomero de un fragmento celular. Se establecen como fragmentos aquellos que tiene de tamaño de 65 a 70 micras en D+2 y de 55 a 60 micras en D+3 (*Johanson M y col. 2003*).
- **Igualdad entre las blastómeros:** cuando el cigoto se divide no siempre lo hace de forma simétrica y sincrónicamente. Generalmente una desigualdad en las células sugiere una calidad más baja (*De Placido G y col. 2002; Hnida C y col. 2004; Steer CV y col. 1992; Van Blerkom J y col. 2000; Veeck LL 1999a*). En ocasiones los embriones tienen un número impar de células y es porque coexisten células con ciclos celulares asíncronos, por ello es fácil pensar que puedan tener diferente tamaño.
- **Visualización de núcleos y grado de multinucleación:** la existencia de la multinucleación, así como de micronúcleos es directamente proporcional a las anomalías cromosómicas (*Hardarson T y col. 2001*). Estos embriones tienen una baja tasa de implantación y un alto porcentaje de aborto, aunque se han descrito nacimientos de niños sanos procedentes de embriones multinucleados (*Jackson y col. 1998; Meriano y col. 2004; Pelinck y col. 1998; Van Royen y col. 2003*). De hecho, la multinucleación parece ser una herramienta de autocorrección, utilizada por embriones mosaicos (con algunas células euploides y otras aneuploides) para deshacerse de las aneuploides y convertirse en un embrión genéticamente normal (*Tesarik J 2018*).



- **Anillo citoplasmático:** aparece en el blastómero como un retraimiento del citoplasma, se relaciona con un proceso de lisis celular (*Veeck LL 1999b*).
- **Presencia de vacuolas:** las vacuolas son inclusiones citoplasmáticas unidas a la membrana y llenas de líquido. Su presencia tanto en ovocitos como en embriones está asociado con una disminución del potencial de implantación. La bibliografía no indica que numero, tamaño o disposición deben tener para disminuir la implantación, pero se sabe que las menores de 5 μm de diámetro no comprometen al embrión (*Van Blerkom J 1990; Ebner T y col. 2005*).
- **Zona pelúcida:** las anomalías en la zona pelúcida se relacionan con una baja tasa de implantación, puede que por la falta de eclosión. Así, una zona pelúcida normal es aquella que tiene unos 17 μm de grosor, es homogénea, no tiene abultamientos, ni doble tabicación y es traslucida. (*Gabrielsen A y col. 2001; Goyanes VJ y col. 1990; Veeck LL 1999b*).
- **Grado de compactación:** la compactación es signo de actividad embrionaria, se forman uniones intracelulares y una polarización embrionaria (*Gadner RL 1989; Veeck LL 1999c*). Existen dos grados de compactación: uno es el inicio de adhesión, en el que se pueden todavía ver las células y contarlas fácilmente y la compactación propiamente dicha en la que es difícil distinguir los blastómeros. Este último se visualiza en el estado de mórula en D+4.
- **Pitting o moteado:** que se presenta como pequeñas y numerosas motas de aproximadamente 1.5 μm . Indica una activación citoplasmática y ocurre en día 3. La aparición de esta granulosis parece estar relacionada con una mejor formación del blastocisto, aunque no tiene gran valor predictivo del pronóstico de la calidad del embrión (*Rienzi L y col. 2003*) o del embarazo (*Desai NN y col. 2000*). Otros estudios han demostrado que las condiciones de cultivo pueden inducir a su aparición (*Biggers JD y Racowsky C 2002; Ebner T y col. 2005a*) en casos extremos aumentan el riesgo de abortos tempranos (*Ebner T y col. 2005b*).



9.3 Día 4, Día 5 y Día 6

La calidad embrionaria se observa también en los **Día 4 (D+4)**, **Día 5 (D+5)** y **Día 6 (D+6)**, y se realiza a las 94-98 horas, 112-120 horas y 136-140 horas, respectivamente. El estadio de blastocisto alcanzado sobre todo en el día 5 es el ideal para transferir (Fig. 9), ya que en algunos casos permite una mejor elección de los embriones.



Fig. 9 Embrión en estadio de blastocisto en el 5º día de su desarrollo



Y los parámetros medidos en D+4, D+5 y D+6 son:

- **Compactación en mórula:** es el estadio en el que es muy complicado diferenciar los blastómeros entre sí. Se observa una masa de células compacta en la que sí que se diferencian los numerosos núcleos. Normalmente comienza en D+4 y debe iniciarse en embriones como mínimo de 8 células. En este paso las células dejan de ser totipotentes y ya es un embrión especializado (*Balaban B y col. 2000*). La compactación conlleva un aumento de la adhesión intercelular y el inicio de la polarización embrionaria (*Gardner RL 1989; Veeck LL 1999; Alikani M 2005; Cockbum K y Rossant J 2010*). Por lo tanto, encontrar esta compactación en D+4 es pronóstico de un buen desarrollo embrionario.

Según el grado de compactación existen 3 modelos:

1. La **compactación total** es la que afecta todas las células del embrión.
 2. La **compactación incompleta** cuando todas las células están en compactación pero en diferentes estadios.
 3. Y la **compactación parcial** cuando solamente algunas células del embrión se compactan y otras mantienen su forma definida de blastómeros.
- **Evolución del embrión a blastocisto:** al estadio de blastocisto se llega en D+5 o D+6, aquellos que llegan en día 7 u 8 tienen un peor pronóstico (*Khorrarn O y col. 2000; Shapiro BS y col. 2001*).
 - **Grado de expansión del blastocele:** el blastocele es la cavidad rellena de líquido que se forma en la evolución del blastocisto. El progresivo aumento de volumen del blastocele es un parámetro de difícil catalogación, ya que depende del tiempo en el que se observa porque el embrión pasa por algunas fases de colapso y recuperación. La expansión blastocélica está relacionada con buenas tasas de implantación (*Shoukir Y y col. 1998*).
 - **Zona pelúcida:** sufre muchos cambios a lo largo del desarrollo del blastocisto. Con su expansión se afina muchísimo y en la eclosión se rompe, siendo esto indicativo de



buen pronóstico (*Balaban B y col. 2000; Racowsky C y col. 2003; Yoon HJ y col. 2001*).

- **Trofoectodermo:** es una mono capa de células que rodea al blastocisto por toda su pared y delimitando el blastocele. El trofoectodermo óptimo es aquel que tiene gran número de células elípticas y regulares. Los trofoectodermos con calidad baja también pueden dar buena implantación siempre que su masa celular interna tenga una morfología normal (*Kovacic B y col. 2004*).
- **Masa celular interna (MCI):** es el conjunto de células que dan lugar al disco embrionario y finalmente al feto. Su evaluación es el parámetro más importante de observación respecto a su viabilidad. Un blastocisto tras 112-120 horas post inseminación debe mostrar una masa celular interna ovalada y con las células compactadas, su tamaño varía entre 1900 y 3800 μm^2 . Los tamaños inferiores denotan baja posibilidad de implantación (*Ritcher KS y col. 2001*).
- **Grado de fragmentación celular:** es el volumen de espacio periplásmico ocupado con fragmentos citoplásmicos. Se mide como una proporción del volumen total y sus grados elevados pueden comprometer la viabilidad del embrión (*Giorgetti C y col. 1995*).

La fragmentación condiciona en sobremanera la calidad embrionaria estableciéndose que la tasa de implantación baja si se transfieren embriones con más de un 10-20% del espacio ocupado por fragmentos. (*Staessen C y col.1992; Giorgetti C y col. 1995; Ziebe S y col.1997*).

Los embriones con mucha fragmentación presentan una mayor tasa de anomalías cromosómicas, principalmente mosaicismos (*Munné S y Cohen J 1998*).



10. TRANSFERENCIA EMBRIONARIA

La transferencia embrionaria es el último paso de todo el proceso de reproducción asistida en el laboratorio y puede realizarse en cualquier momento tras la división embrionaria, normalmente es en D+3.

La transferencia se realiza vía vaginal y guiada ecográficamente por vía abdominal. No requiere anestesia por lo que la paciente está consciente en todo momento y no debe sentir dolor alguno.

En el laboratorio, en el interior de una cabina de flujo laminar y a la temperatura de 37°C, previamente se dispone de un campo estéril donde se prepara el catéter de transferencia embrionaria indicado para esta paciente en concreto. (Fig.10)

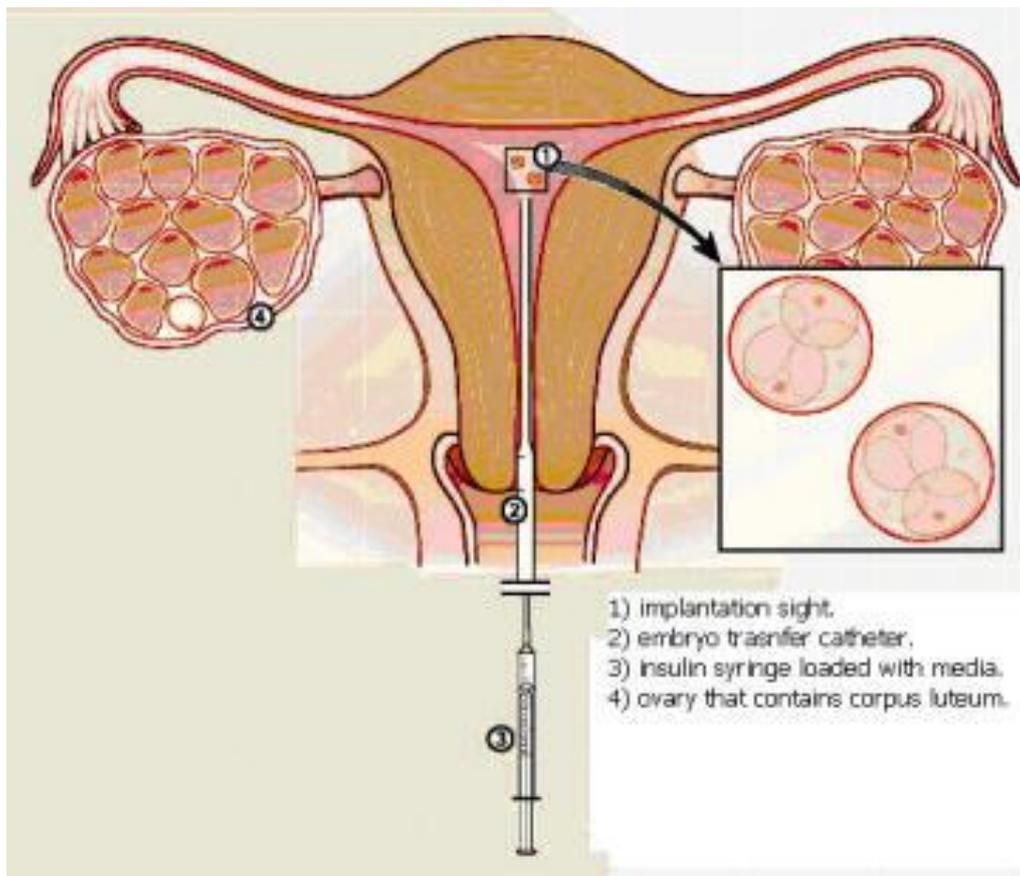


Fig. 10 Transferencia embrionaria

**Nuevos avances en Reproducción Asistida.
Mejora de la calidad ovocitaria y de la receptividad uterina**



11. SOPORTE DE LA FASE LÚTEA

El ciclo de la mujer, como hemos visto anteriormente, consta de diferentes fases y es después de la ovulación cuando comienza la fase lútea, también llamada luteínica, que dura hasta el momento de la menstruación. Recibe el nombre de lútea, debido al cuerpo amarillo o lúteo formado por los restos del óvulo expulsado del ovario y que produce diferentes hormonas, entre ellas la progesterona. Esta hormona es la responsable de la transformación del endometrio de la fase proliferativa a la fase secretora, necesaria para la implantación del embrión.

Con respecto a esta transformación obligatoria, se conoce que cuando las mujeres participan en un programa de FIV, en el acto de la punción folicular, la aspiración de las células de la granulosa que rodean al ovocito y el uso de agonistas de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRh) puede interferir en la producción de progesterona durante la fase lútea, haciendo que los niveles de dicha hormona disminuyan considerablemente (*García J y col. 1981*). Este descenso de progesterona se traduce en una menor probabilidad de implantación embrionaria y por lo tanto de embarazo (*Ginsburg KA 1992*).

Otros estudios demuestran que cualquier protocolo de la estimulación ovárica, por sí mismo, compromete el proceso de luteinización de los folículos ováricos, y por lo tanto también la transformación adecuada del endometrio, independientemente de la aspiración de los folículos (*Beckers NG y col. 2003; Fauser BC y Devroey P 2003*)

Consecuentemente, en tratamientos que utilizan la estimulación ovárica hay que proporcionar suplementos hormonales durante la fase lútea para reemplazar las hormonas naturales que les faltan. Dicho apoyo de la fase lútea se puede realizar administrando gonadotropina coriónica humana (hCG) o más común, con progesterona, vía vaginal y/o oral y/o intramuscular y/o transdermal (*Daya S y Gunby J 1992*).



12. OBJETIVOS

1.- Estudiar el efecto de la hormona de crecimiento (GH), administrada en la fase folicular, en la calidad ovocitaria utilizando diferentes marcadores morfológicos, así como la de los embriones resultantes de su fecundación con espermatozoides normales.

2.- Estudiar el efecto de la hormona de crecimiento (GH), administrada en la fase proliferativa o folicular del desarrollo endometrial, para tratar de mejorar la implantación embrionaria, utilizando un modelo fundado en el análisis de casos raros de fracasos repetidos en el programa de ovodonación.

3.- Estudiar el efecto del agonista de la GnRH, administrado en la fase secretora o lútea, para mejorar la receptividad uterina y por consiguiente la anidación del embrión.



MATERIAL Y METODOS



1. PARTICIPANTES

1.1. Estudio sobre el efecto de la hormona de crecimiento (GH) sobre la calidad ovocitaria y embrionaria.

Estudio en 98 mujeres con problemas de fertilidad (Fig. 11).

Se establecieron dos grupos:

- A) Un grupo de 52 mujeres con tratamiento complementario de GH durante la estimulación ovárica.
- B) Otro grupo de 46 mujeres sin tratamiento complementario de GH durante la estimulación ovárica, como grupo control.

Características comunes a los grupos:

- Mujeres entre 30 y 39 años, con índice de masa corporal, tiempo de esterilidad recuento de folículos antrales, y niveles de AMH similares (Tabla 1).
- Protocolos anteriores con fallo de implantación.
- Técnica de FIV, microinyección intracitoplasmática del espermatozoide (ICSI).
- Morfología espermática dentro de los parámetros de la normalidad.

Criterios de exclusión:

- Quedaron excluidas aquellas que sus parejas tenían azoospermia que requería biopsia testicular.



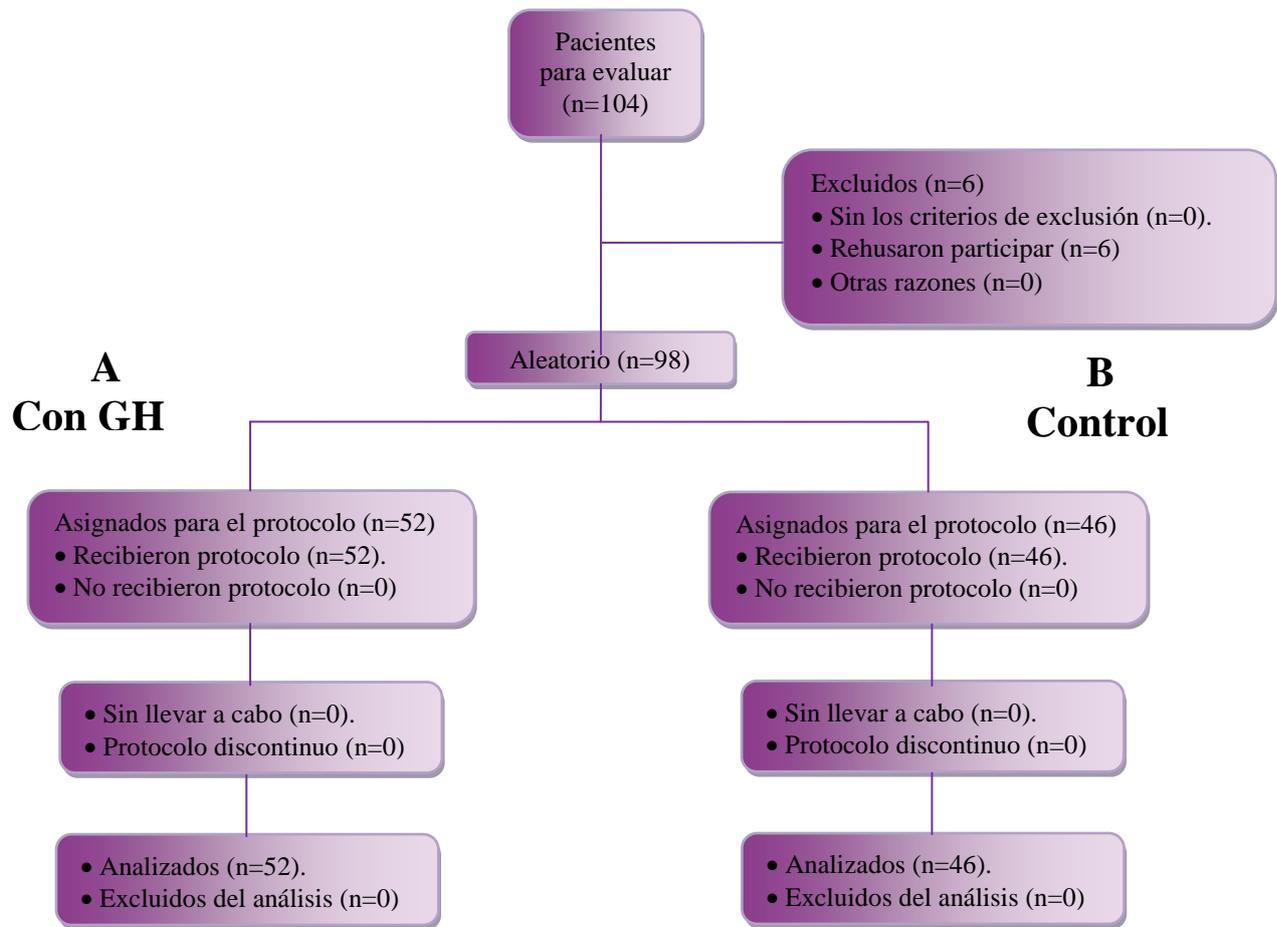


Fig. 11 Diseño del estudio del efecto de la GH sobre la calidad ovocitaria: 98 mujeres distribuidas entre dos grupos, A: 52 de ellas tratadas con GH y B: 46 sin GH como grupo control



1.2. Estudio del efecto de la hormona de crecimiento (GH) sobre la receptividad uterina.

Estudio en 105 mujeres infértiles con programa de donación de ovocitos (Fig. 12).

Se establecieron dos grupos:

- A) Un grupo de 70 mujeres con fallos repetidos de implantación (RIF). Dos subgrupos de 35 mujeres tratadas con hormona de crecimiento (GH) y otras 35 sin GH.
- B) Otro grupo de 35 mujeres como control positivo, siendo este su primer intento con donación de ovocitos y sin antecedentes de RIF.

Características comunes a los grupos:

- Mujeres con protocolo de donación de óvulos.
- Receptoras de óvulos con edad entre 30 y 51 años.
- Donantes de óvulos con edades inferiores a 25 años.
- Donantes estimuladas con protocolos largos con agonistas.
- Mujeres con dos fallos previos de implantación.
- Dos grupos comparten características demográficas parecidas.
- Técnica de FIV, microinyección intracitoplasmática del espermatozoide (ICSI).
- Transferencias de embriones en fresco.

Criterios de exclusión:

- Transferencias de embriones congelados.



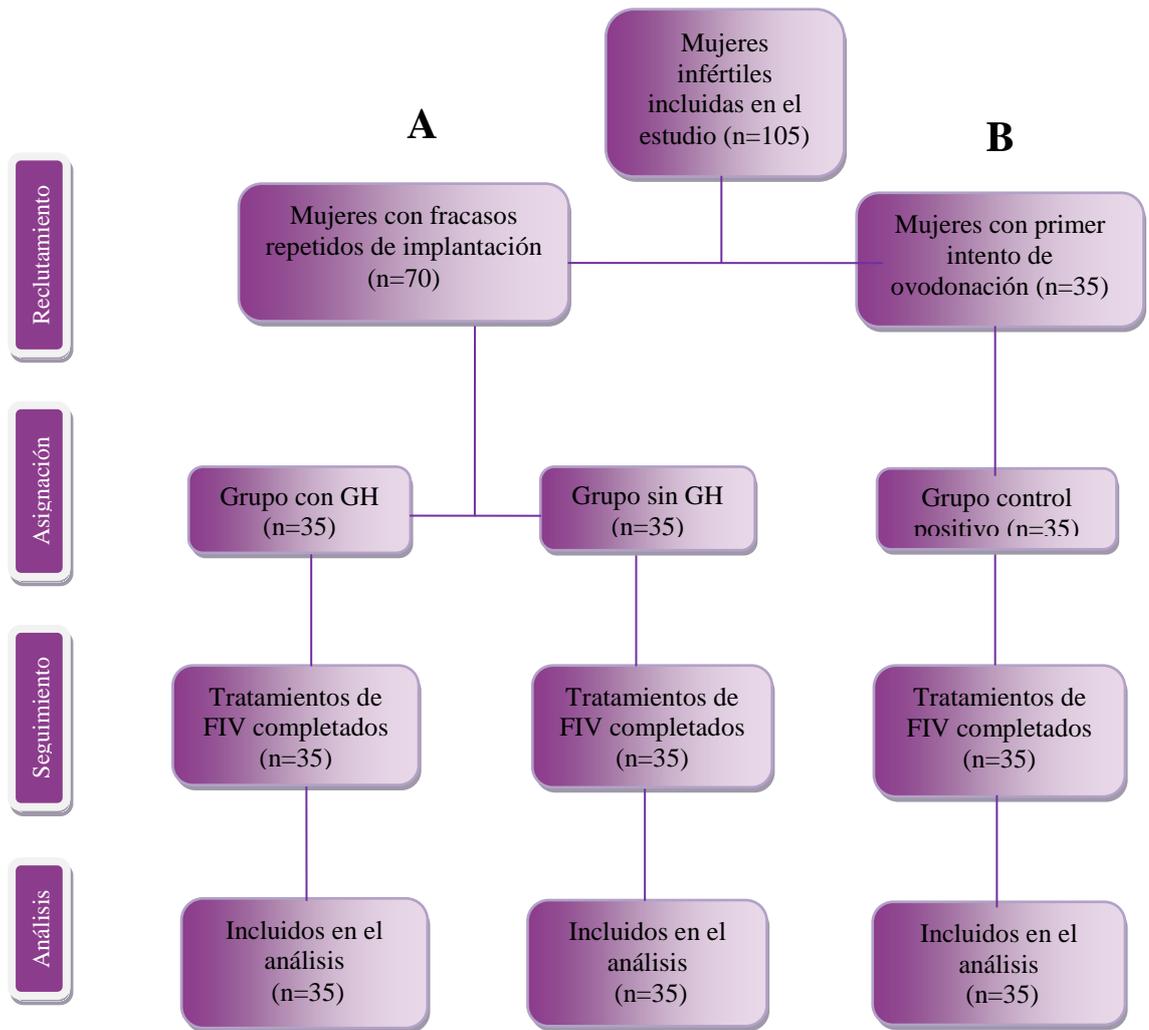


Fig. 12 Diseño del estudio del efecto de la GH sobre la receptividad uterina: 105 mujeres distribuidas entre 2 grupos, A: 70 en dos subgrupos de 35 y 35, siendo uno de los grupos tratados con GH y el otro sin GH y B: 35 sin GH como grupo control



1.3 Estudio sobre el efecto del agonista de la GnRH sobre la receptividad uterina.

Estudio en 50 mujeres sometidas a una estimulación ovárica controlada por un antagonista de GnRH y desencadenadas con la HCG (Fig. 13).

Se establecieron 2 grupos:

- A) Grupo de 25 mujeres a las que se les somete a un ciclo de FIV con la administración de no solo la progesterona (600 mg diarios) como en el primer ciclo sino también con la administración de inyecciones diarias de 0.1mg de Triptorelina (*Decapeptyl, Ipsen Pharma*) durante 14 días desde el día de la transferencia embrionaria.
- B) Grupo de 25 mujeres a las que se les repite el mismo protocolo de soporte de la fase lútea (600 mg diarios) como en el ciclo precedente pero sin usar el agonista de la GnRH en la fase lútea.

Características comunes a los grupos:

- Mujeres con edades comprendidas entre 25 y 40 años de edad.
- Con valores hormonales dentro de la normalidad.
- Todas las sometidas al estudio compartían un primer intento fallido de FIV por mostrar bajos niveles de progesterona en el día 14 después de la transferencia embrionaria, a pesar de tener un soporte de la fase lútea de 600 mg diarios desde el mismo día de la transferencia.
- Técnica de FIV, microinyección intracitoplasmática del espermatozoide (ICSI).
- Se utilizaron los mismos protocolos de estimulación ovárica, fecundación in vitro y transferencia de los embriones.
- En este estudio se han utilizado muestras de semen en fresco.



- Todos los embriones transferidos son en fresco, tres días después de la punción ovocitaria.

Criterios de exclusión:

- Parejas con factor masculino severo o con azoospermia obstructiva que requirieran la recuperación de espermatozoides mediante biopsia testicular.
- Contraindicaciones para la técnica de FIV, hiperprolactinemia, diabetes, síndrome de Cushing, índice de masa corporal superior 30, enfermedad tiroidea, endometriosis severa, presencia de pólipos uterinos, síndrome de ovario poliquístico, adenomiosis, bajas respondedoras, mujeres de edad mayor de 40 años.
- Muestras de esperma congelado.
- Ciclos con transferencia en estadio de blastocisto.



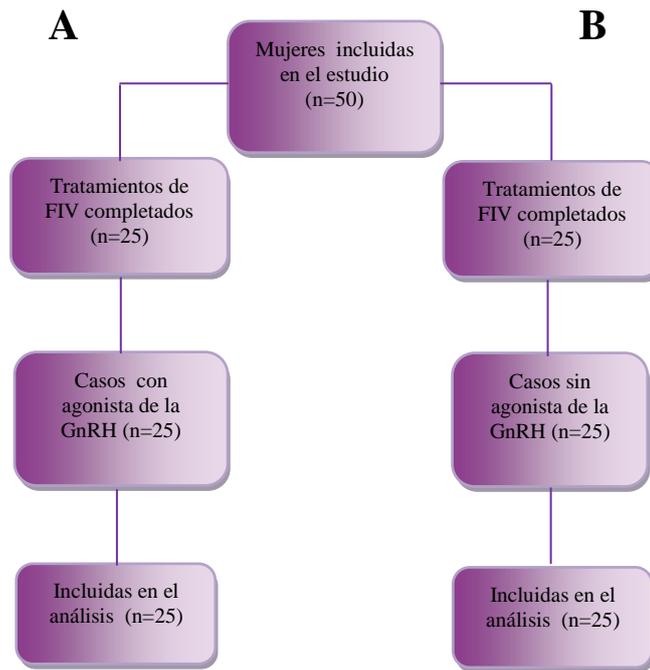


Fig. 13 Diseño del estudio del efecto del agonista de la GnRH sobre la receptividad uterina. 50 mujeres en dos grupos, 25 con agonista de la GnRH y 25 de ellas sin el apoyo de la fase lútea.



2. PROTOCOLOS DE ESTIMULACIÓN OVÁRICA

Se han seguido dos tipos diferentes de estimulación ovárica, una usando los agonistas de la GnRH empezando en la fase lútea y con una previa regulación negativa de la pituitaria, y otra usando los antagonistas de la GnRH para prevenir un incremento prematuro de la LH.

2.1 Protocolo largo con agonista de la GnRH

La baja regulación hipofisaria se logró con el uso diario de inyecciones de 0,1 mg. de triptorelin (*Decapeptyl 0,1 mg.; Ipsen Pharma, Barcelona, España*) a partir de la fase lútea del ciclo anterior al de la estimulación ovárica y se redujo a 0,05 mg. al día.

La dosis a partir del primer día de la regla. La gonadotrofina se inició 2-7 días después del comienzo del sangrado. Esta terapia se llevó a cabo con el uso de FSH recombinante (*Puregon, Organon, Oss, Holanda o GONAL F; Serono, Roma, Italia*) y HMG (*Menopur; Ferring Pharmaceuticals, Langley, Berkshire, Reino Unido*). La dosis de FSH y HMG se fueron continuamente adaptando en función de las concentraciones séricas de E₂ y LH y la dinámica del crecimiento folicular ovárico, tal como se describe (*Tesarik J y Mendoza C 2002*) con el objetivo de mantener la concentración sérica de LH en el rango de 0.5-1.5 UI l⁻¹ en todo el período de estimulación. La ovulación se indujo con 250 µg de HCG recombinante cuando al menos tres folículos un diámetro medio de 18 mm. El tratamiento con triptorelin se detuvo el día de la administración de la HCG.

2.2 Protocolo con antagonista de la GnRH

La administración de FSH recombinante y de la HMG se inició en día 2 de sangrado menstrual tras la retirada de la píldora anticonceptiva (*Tri-Minulet; Wyeth Lederle, Madrid, España*), administrada durante el mes anterior al ciclo de estimulación ovárica. La dosis de FSH y HMG se adapta continuamente en función de las concentraciones séricas de E₂ y LH y de la dinámica del crecimiento folicular ovárico. Se desarrolla de la misma manera que en el protocolo largo de la agonista de la GnRH (anteriormente descrito).



Con antagonistas de la GnRH (*Orgalutran; Organon o Cetrotide, Serono*) se inició el día 5 con una dosis diaria de 0,25 mg, hasta un mínimo de tres folículos un diámetro de \geq 18 mm. Entonces se indujo la ovulación con 250 μ g de HCG recombinante (Ovitrelle).



3. PUNCIÓN FOLICULAR

Alrededor de 36 horas tras la administración de hCG, se realiza la punción folicular tras la sedación de la paciente.

El protocolo de laboratorio comienza el día previo a la punción, con el cultivo a 37° y CO₂ al 6% de los medios específicos para la recogida, eliminación de las células del cúmulus oophorus y corona radiata (desnudación), tratamiento y cultivo de los ovocitos y embriones. Se realiza en el quirófano en condiciones de esterilidad.

El material utilizado en quirófano es:

- Una bomba de vacío. (*Labotect 4014*).
- Set de punción (*Labotect ref. 13438*) unido a la bomba constituido un tapón de silicona que tiene dos cánulas, una es la de la aguja de aspiración y otra es la que se posiciona en la bomba. El tapón se introduce en un tubo estéril para hacer el vacío, y es en él donde se transportan los líquidos foliculares hasta el laboratorio.
- Equipo ecográfico (*Hitachi EUB 525*) porque la intervención se realiza vía vaginal y guiada por el mismo.
- Lo ideal es contar con un laboratorio que diste lo mínimo posible con el quirófano, si no es el caso debemos tener un bloque térmico para garantizar el mantenimiento de la temperatura en los líquidos foliculares y la revisión en campana estéril y bajo la lupa.

El material utilizado en laboratorio es:

- Cabina de flujo laminar con superficie calefactada. (*K- System, L-126D*).
- Lupa binocular (*Olympus SZX12*).
- Tubos de punción estériles. (*Falcon, ref. 35 2001*).
- Placas petri de 100 x 20 mm. (*Falcon, ref. 35 1005*).



- Placas petri de 4 pocillos.(*Nunc, ref. 144444*).
- Micropipeta. (*Piperman*).
- Puntas estériles. (*Sarstedt, ref.70.760.202*).
- Medios de la placa Nunc: G-IVF plus, Gmops plus, (*Vitrolife*)

3.1 Preparación del material

Las placas petri de 4 pocillos con los medios de cultivo se preparan el día anterior a la punción, una placa por paciente (si tiene gran cantidad de folículos se pueden proveer otras placas.) y se colocan en un incubador de CO₂ al 6% y 37°C de temperatura.

La cabina de flujo debe tener una temperatura de 37°C y en ella dispondremos los demás materiales.

3.2 Proceso de obtención y lavado de los ovocitos

Se disponen en el interior de la cabina de flujo laminar el material que vamos a utilizar en la punción para que tenga una temperatura similar a 37°C.

Debajo de la lupa colocamos la placa petri de 100 x 20 mm e iremos vertiendo los líquidos foliculares obtenidos en la punción. (Fig. 14)

Los ovocitos con su cumulus son perfectamente visibles a simple vista como una masa refringente, aun así hay que verificar con la lupa que efectivamente se trata de un ovocito. Inmediatamente localizado y verificado se introduce intentando transportar la menor cantidad posible de sangre al medio de cultivo de lavado.

Una vez terminado el chequeo del contenido de todos los tubos, los ovocitos inicialmente transferidos en el medio de lavado, se pasarán uno a uno a otro medio de cultivo que los mantiene equilibrados y donde estarán hasta su desnudación.



Los ovocitos maduros (metafase II) fueron incubados a 37 ° C (entre 3 y 6 horas) en medio de cultivo G-IVF (*Vitrolife*) equilibrado con un 6% de CO₂ en el aire. Posteriormente se desnudaron las células del cumulus oophorus y la corona radiata, como se describe (*Tesarik J y Mendoza C 2002*) Y se incubaron en medio G1 (*Vitrolife*) con el mismo % de CO₂.

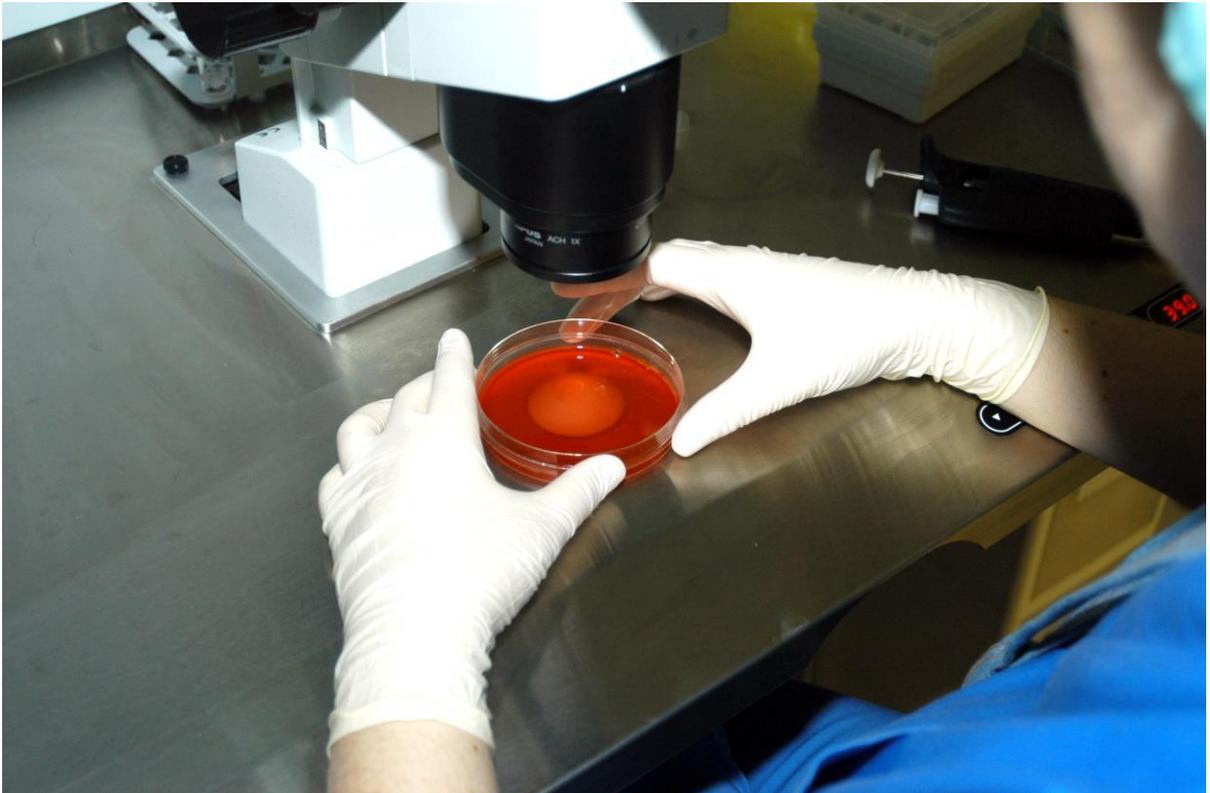


Fig. 14 Búsqueda de los ovocitos en los líquidos foliculares durante la punción folicular



4. MICROINYECCIÓN INTRACITOPLASMÁTICA DEL ESPERMATOZOIDE

La técnica utilizada de fecundación en el laboratorio fue la microinyección intracitoplasmática del espermatozoide o ICSI. Es la técnica de Reproducción Asistida en la que se introduce un espermatozoide mediante una técnica de micromanipulación en cada uno de los ovocitos de la paciente.

4.1 Preparación de la muestra de esperma.

El material utilizado es:

- Tubos estériles. (*Falcon, ref. 35 2095*).
- Pipetas Pasteur (*Falcon, ref. 35 7575*).
- Medio de cultivo para lavar (*GAMETE, Vitrolife*).
- Centrifuga (*Sigma 2-5*).

La muestra de semen del paciente debe estar licuada totalmente para poder ser tratada, es decir alrededor de 20 minutos después de ser obtenida. Inmediatamente se lava con medio de cultivo adecuado de varias maneras. El método más utilizado es el de SWIN-UP que consiste en introducir en un tubo estéril alrededor de 1 ml de muestra y diluirla con 9 ml de medio de lavado. Se agita bien el tubo y se centrifuga a 1500 rpm durante 5 min. Se desprecia el sobrenadante y encima del precipitado se coloca, con mucho cuidado de no alterar el precipitado, una pequeña cantidad de medio de cultivo (alrededor de 0,5 ml), y que forma una capa superficial a la que nadarán los espermatozoides más fuertes. Es una manera rápida y sencilla de selección de los mejores espermatozoides.



4.2 Preparación de los ovocitos.

El material utilizado es:

- Hialuronidasa (*Hyase, Vitrolife*).
- Medio de dilución de la Hialuronidasa (*Gmops, Vitrolife*).
- Pipeta de desnudación (*Stripper, Mid-Atlantic Diagnostics, Inc.*).
- Capilares para el stripper (*Strippers Tips #MXL3-135µm, Mid-Atlantic Diagnostics, Inc.*).
- Micropipeta (*Piperman*).
- Puntas estériles. (*Sarstedt, ref.70.760.202*).
- Incubador (*Labotect C-200*).

Los ovocitos deben desnudarse antes de la microinyección. La desnudación consiste en la eliminación de las células del cumulus oophorus que los rodea. Para ello se utiliza hialuronidasa que las disgrega. La corona radiata desaparece cuando se hace pasar por un capilar de diámetro parecido al del ovocito (135µm).

Este proceso es delicado y puede ocurrir la fracturación de la zona pelúcida (FZP), que nos indica una baja calidad ovocitaria (*Mendoza C y Testart J 1986*).

Una vez los ovocitos desnudados se puede observar su estado de calidad y madurez, desde (vesícula germinativa, metafase I, metafase II, atrésico, FZP, anómalo...). Los ovocitos desnudados deben permanecer un corto tiempo en el incubador para recuperarse, lo suficiente para preparar las agujas y la placa de microinyección.



4.3 Preparación del sistema y proceso de microinyección.

El material utilizado es:

- Microscopio invertido, (*Olympus IX71*).
- Microinyector (*Narishige, IM-9B*).
- Pletina calefactada (*Tokai, MATS-U55R30*).
- Microagujas (*ICSI MIC 35-30 y HOLDING SMP- SM – 30, Humagen*).
- Placa petri (*Falcon, 35 1008*).
- Gotas de Polyvinylpirrolidona (PVP) para espermatozoides (*ICSI, Vitrolife*).
- Gotas para ovocitos (*Gmops, Vitrolife*).
- Aceite (*Ovoil, Vitrolife*).

La ICSI se realiza en un microscopio invertido en una mesa antivibratoria, con un sistema hidráulico de jeringas (microinyector), una de sujeción y otra de inyección. Se debe mantener en todo momento una temperatura de 37°C que se consigue gracias a una pletina calentada.

Las microagujas son individuales para cada paciente y se colocan de la manera siguiente: a la izquierda la de HOLDING (sujeción del ovocito) y a la derecha la de ICSI (inyección del espermatozoide), quedando en el mismo plano, enfrentadas en línea recta.

Para la placa de ICSI se utiliza la parte superior de la placa petri pequeña de 35 x 10 mm. En ella, se realizan varias microgotas: dos de Polyvinylpirrolidona (PVP) que es una sustancia viscosa que mantiene a los espermatozoides en un estado menos móvil, la primera es donde se coloca una ínfima parte de la muestra y la segunda se utilizará para cortar la cola del espermatozoide y montarlo en la micropipeta para la inyección. Las demás gotas serán de Gmops un medio específico para el mantenimiento de los ovocitos



durante la inyección. La cantidad de gotas variará dependiendo del número de ovocito a inyectar.

El conjunto de todas las gotas se cubre con aceite hasta el borde de la placa, para evitar la desecación. Una vez se ha preparado la placa dispondremos en ella los ovocitos y la colocaremos en el inyector.

Proceso de inyección espermática:

Las agujas se colocan en el mismo plano donde están los ovocitos y los espermatozoides.

El espermatozoide se aspira en la pipeta de inyección toma el espermatozoide y se pasa a la gota de PVP donde se deposita y se le pisa la cola con la misma aguja con un movimiento rápido hacia los lados.

Esta técnica de inmovilización del espermatozoide es imprescindible para que haya una eficiente fertilización del óvulo. La inmovilización provoca en el espermatozoide la rotura de su membrana plasmática y liberación de factores que inducen en el ovocito las oscilaciones de Ca^{2+} , es decir, la activación del mismo. Por otro lado, la inmovilización provoca también una activación citosólica en el espermatozoide que permite la exposición del centriolo proximal al ovocito para la consecuente distribución cromosómica en el embrión.

En la gota del ovocito se introduce la pipeta de HOLDING que sujeta el ovocito siempre en una posición particular para no interceder con el huso acromático.

Las agujas entonces deben quedar enfrentadas perfectamente en línea recta y con la misma inclinación. En la aguja de inyección se lleva el espermatozoide hasta la misma punta y entonces se presiona sobre la zona pelúcida hasta que puede superarla e introducir la punta en el citoplasma. Para poder romper la membrana plasmática se absorbe con la pipeta de inyección hasta notar que se relaja y entonces se introduce la aguja hasta más o menos la mitad del citoplasma donde se irá expulsando el citoplasma, cuando se va acercando la cabeza del espermatozoide se introducirá la aguja hasta casi tocar el extremo



distal del ovocito y es ahí donde se alojará (Fig. 15). Se retira la microaguja lentamente para no arrastrar el espermatozoide y se inicia de nuevo todo el proceso con los demás ovocitos.

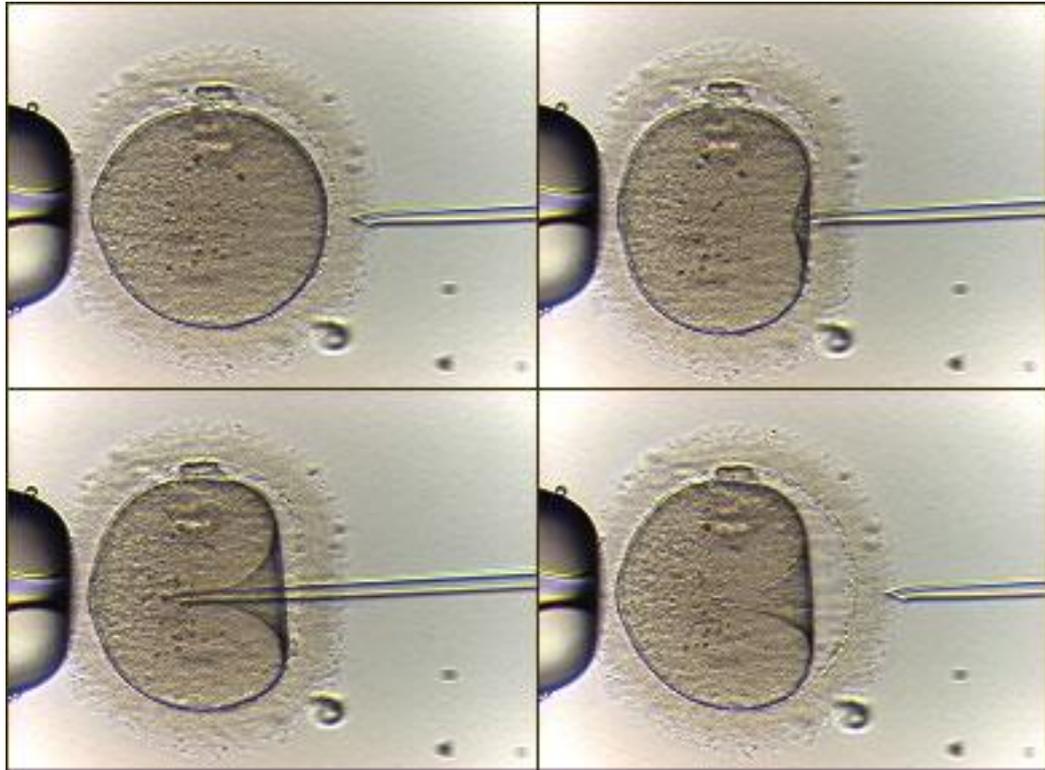


Fig. 15 Microinyección intracitoplasmática del espermatozoide.



5. MARCADORES DE CALIDAD OVOCITARIA

Una fase importante en las técnicas de reproducción asistida es la elección de los ovocitos de buena calidad con el fin de poder obtener embriones con un óptimo desarrollo.

Generalmente, los ovocitos son evaluados, por toda la comunidad científica, basándose en 6 parámetros como son, tamaño y forma del ovocito (*Ebner T y col, 2008; Balakier H y col, 2002*), calidad del citoplasma (*Esfandiari N y col, 2006; Wallbutton S y Kasraie J 2010; Fancsovits P y col. 2011*), estructura del espacio perivitelino (*Farhi J y col. 2002*), zona pelúcida (*Balakier H y col. 2012*) y morfología del corpúsculo polar (*Ciotti PM y col. 2004; Navarro PA y col. 2009*). Nosotros hemos añadido otros parámetros como, presencia del retículo endoplasmático, calidad de la membrana plasmática, recepción del espermatozoide en el citoplasma del ovocito y cono de inyección. Al incluir dichos parámetros, en total 9, hemos observado diferencias significativas que nos han dado a entender que la posterior elección de los embriones para la transferencia uterina, era más idónea para poder obtener un embarazo evolutivo. Dichos resultados no están incluidos en este trabajo de tesis ya que aún no están publicados.



5.1 Tamaño y forma del ovocito

El diámetro de los ovocitos se ha valorado según su proximidad a las 1500 micras, que corresponden a un ovocito maduro y forma ovoide (Fig. 16 y 17).

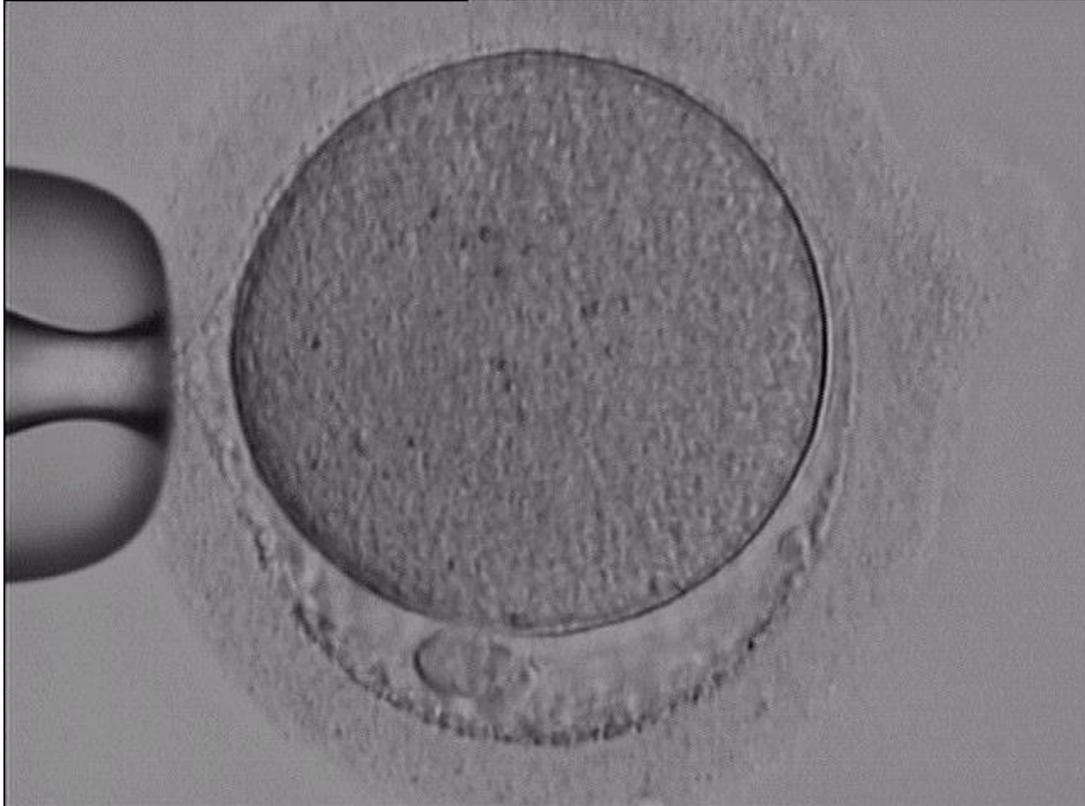


Fig. 16 Ovocito con tamaño y forma normal





Fig. 17 Ovocito con tamaño y forma anormal

5.2 Citoplasma

Esta variable se ha puntuado teniendo en cuenta la homogeneidad granular del mismo, así como la presencia de inclusiones y vacuolas (Fig. 18 y 19).

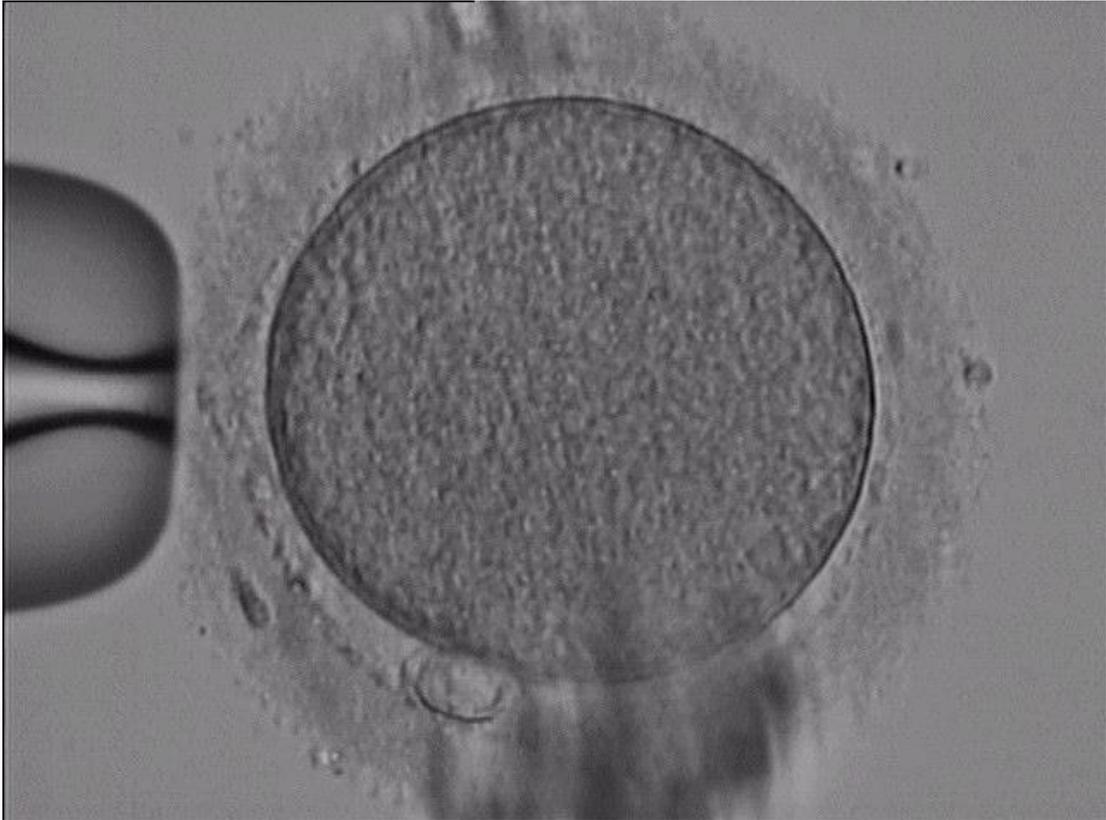


Fig. 18 Ovocito con citoplasma normal



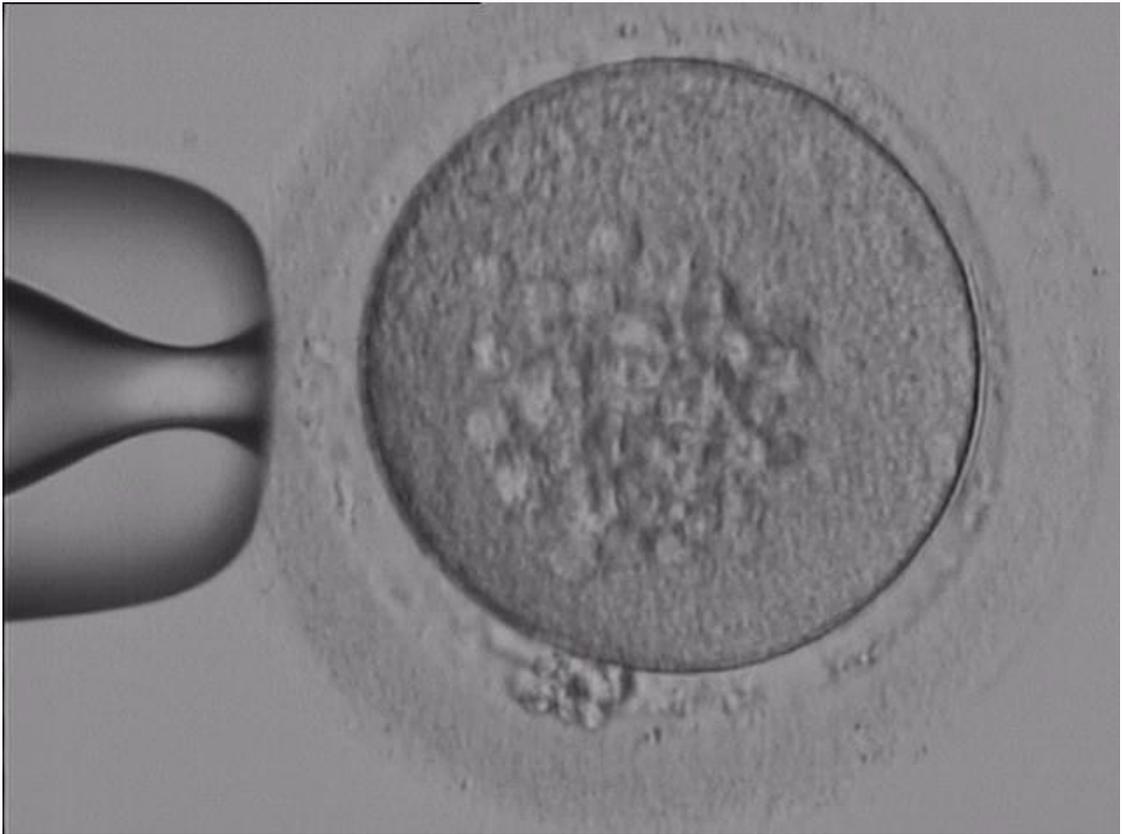


Fig. 19 Ovocito con citoplasma con inclusiones



5.3 Primer Corpúsculo polar

Se ha valorado según tamaño y forma adecuados y sin fragmentación (Fig. 20 y 21).



Fig. 20 Ovocito con único y bien formado primer corpúsculo polar



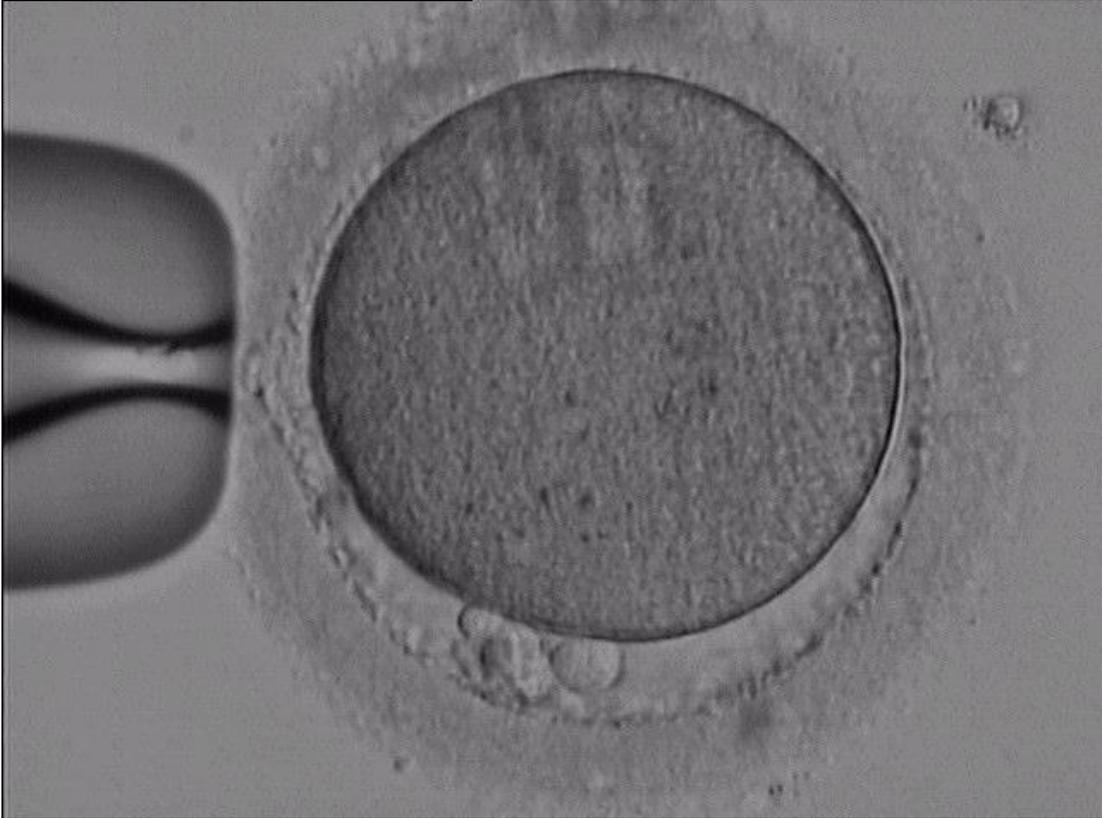


Fig. 21 Ovocito con primer corpúsculo polar fragmentado



5.4 Zona pelúcida

Este marcador se ha valorado según su tamaño, densidad y presencia de septos (Fig. 22 y 23).



Fig. 22 Ovocito con zona pelúcida con tamaño y densidad normal





Fig. 23 Ovocito con zona pelúcida con presencia de septo



5.5 Espacio perivitelino

En esta variable se ha tenido en cuenta un tamaño adecuado y sin inclusiones (Fig. 24 y 25).

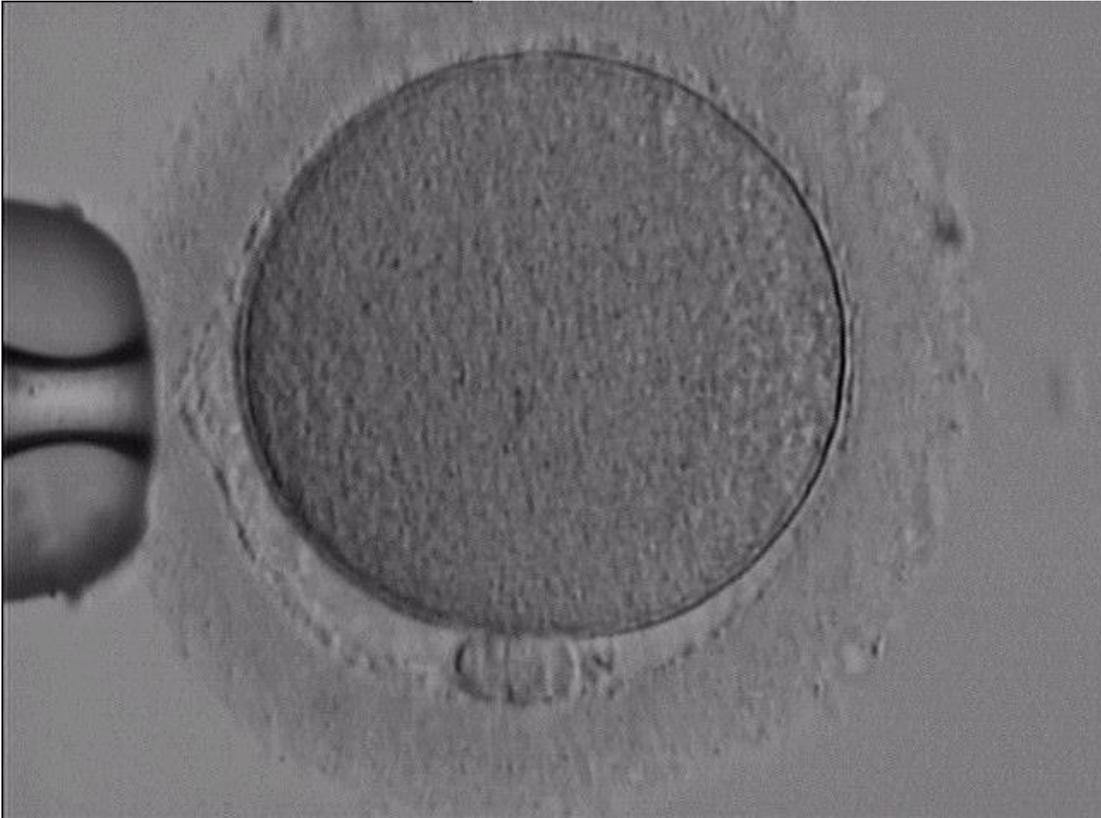


Fig. 24 Ovocito con espacio perivitelino correcto



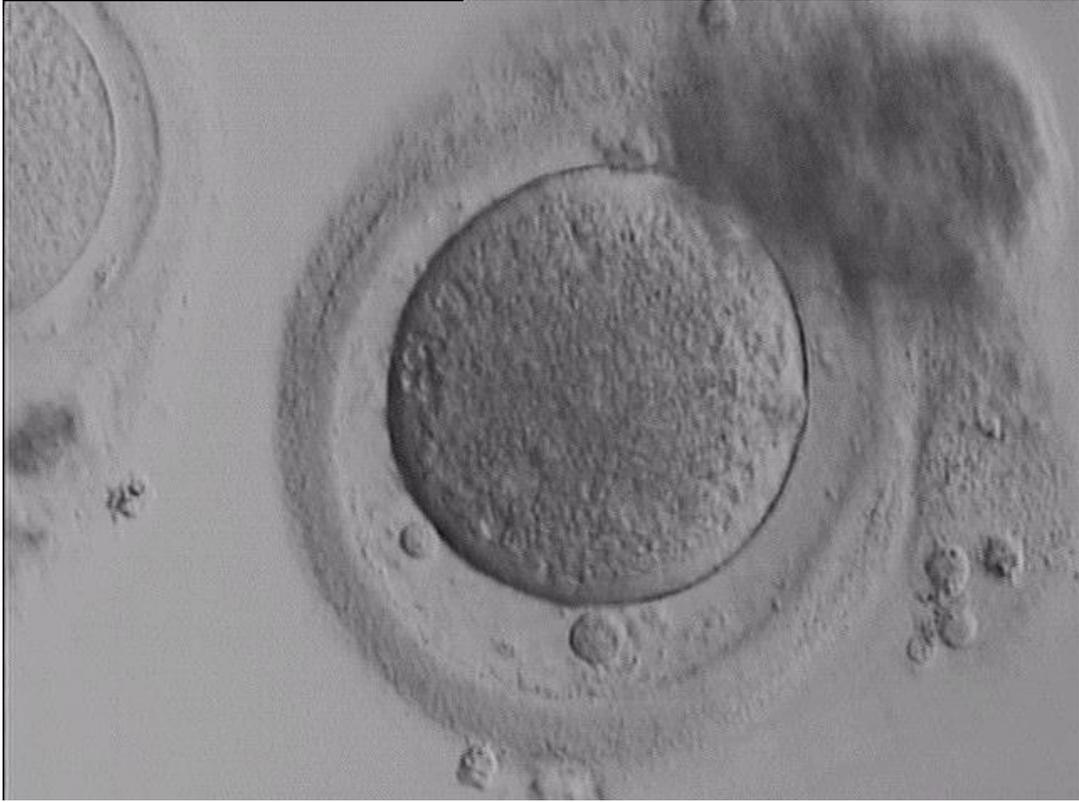


Fig. 25 Ovocito con espacio perivitelino ampliado



5.6 Retículo endoplasmático

Se ha valorado según su presencia (Fig. 26).

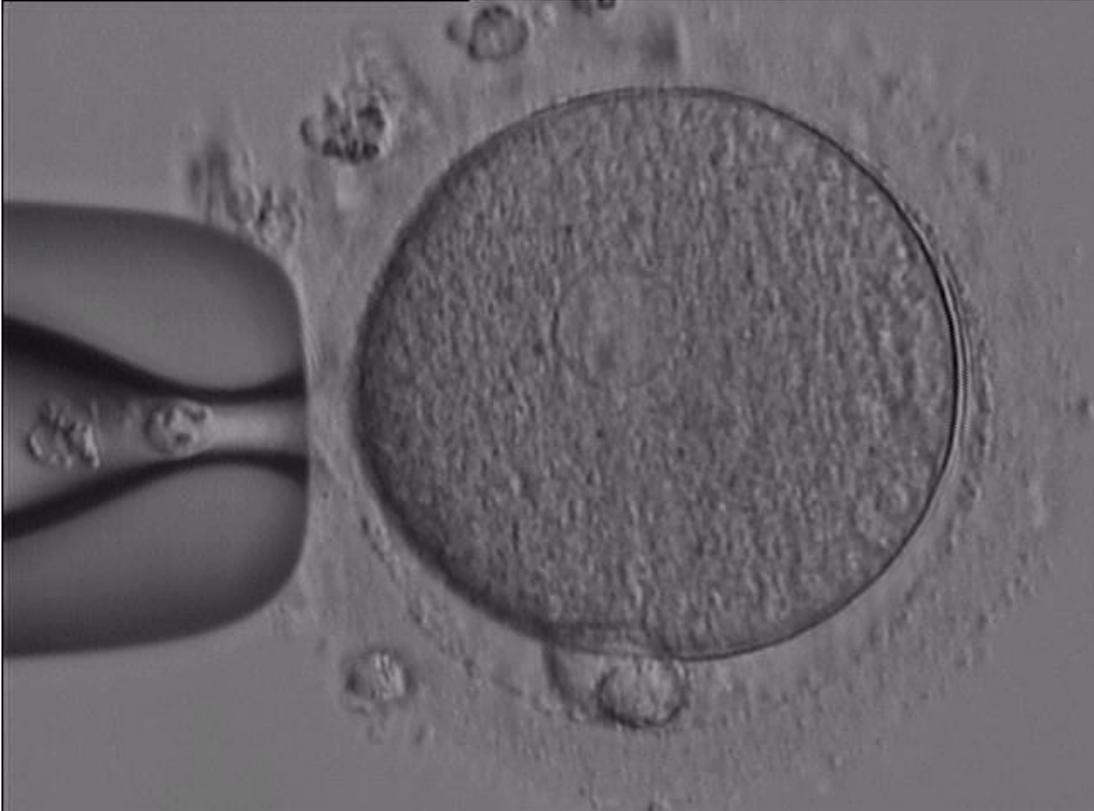


Fig. 26 Ovocito con presencia de retículo endoplasmático



5.7 Membrana plasmática

En este marcador se ha observado la elasticidad que presenta el ovocito en el momento de introducir la aguja de microinyección (Fig. 27).

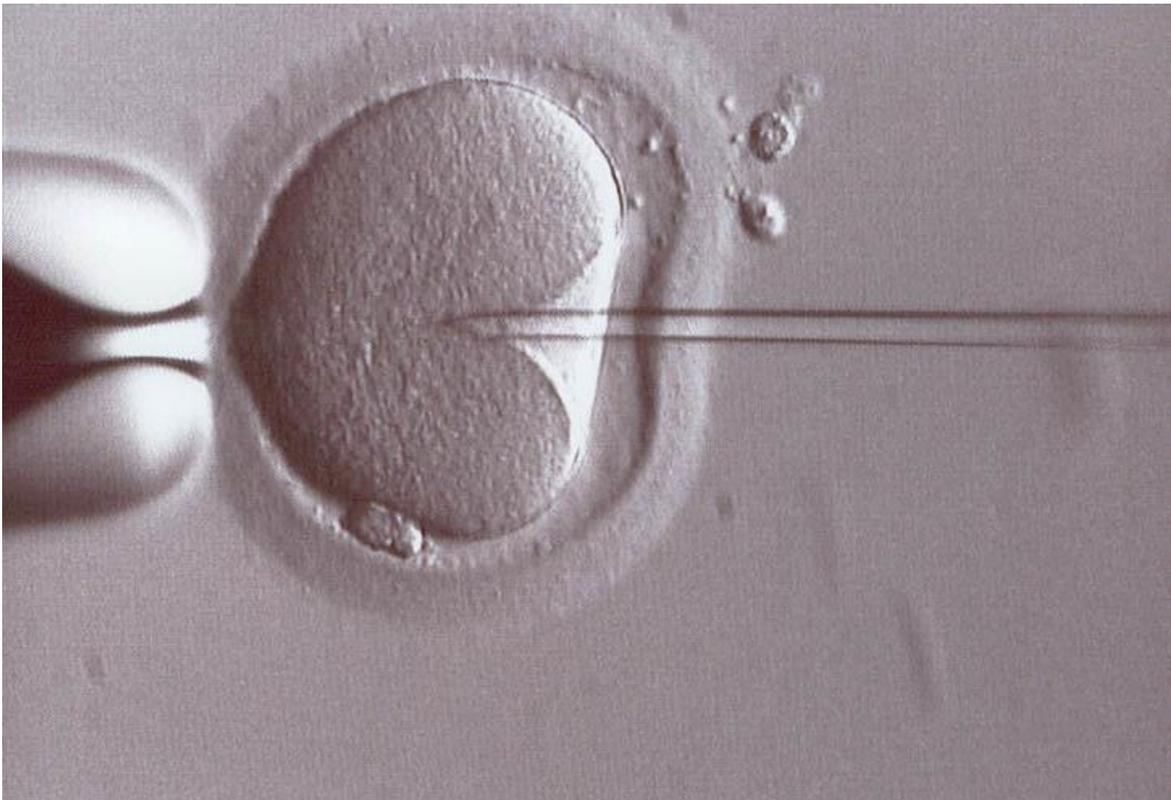


Fig. 27 ICSI, acercamiento del espermatozoide al extremo de la aguja y comienzo de la maniobra de rotura de la membrana plasmática



5.8 Recepción del espermatozoide

Dicho marcador se ha valorado dependiendo de la capacidad de inclusión del espermatozoide en el momento en que es depositado en el interior del citoplasma mediante la microinyección del mismo. Se da el valor más alto a aquel en el que el desplazamiento del espermatozoide es menor al dejarlo en el interior del citoplasma ovocitario (Fig. 28).



Fig. 28 ICSI, retirada de la aguja, se observa la recepción del espermatozoide en la zona opuesta a la de inyección.



5.9 Cono de inyección

Esta variable se refiere a la impresión que queda en el ovocito después de retirar la aguja de microinyección y se da el valor más alto al que presenta un cono mayor lo que se traduce en una mayor resistencia (Fig. 29 y 30).

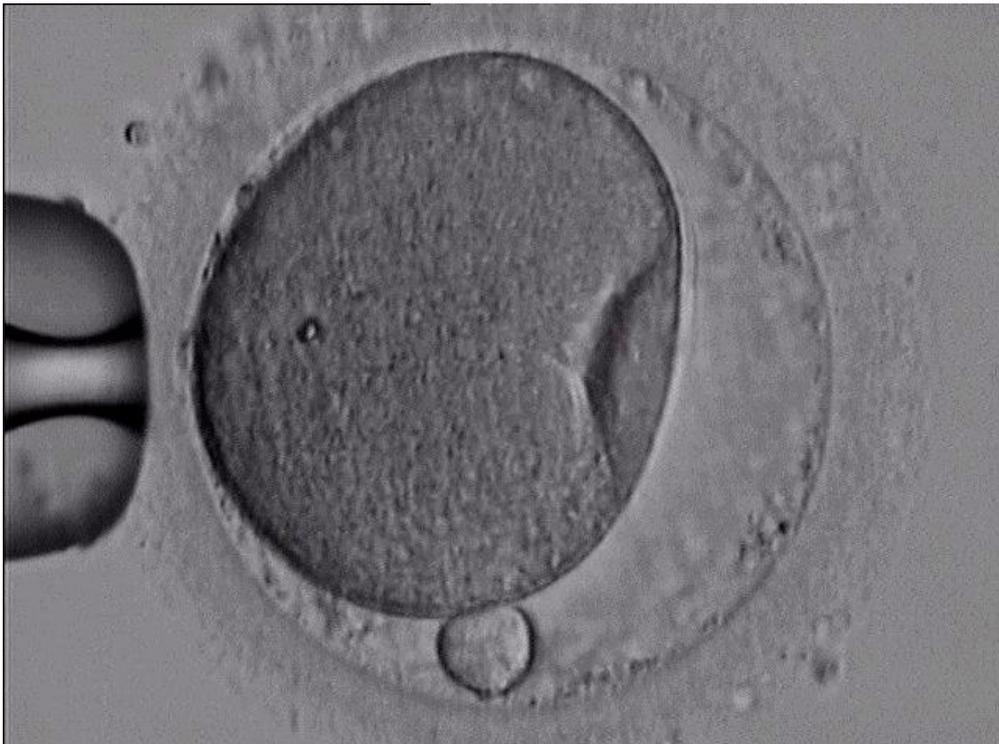


Fig. 29 Ovocito con cono de inyección correcto



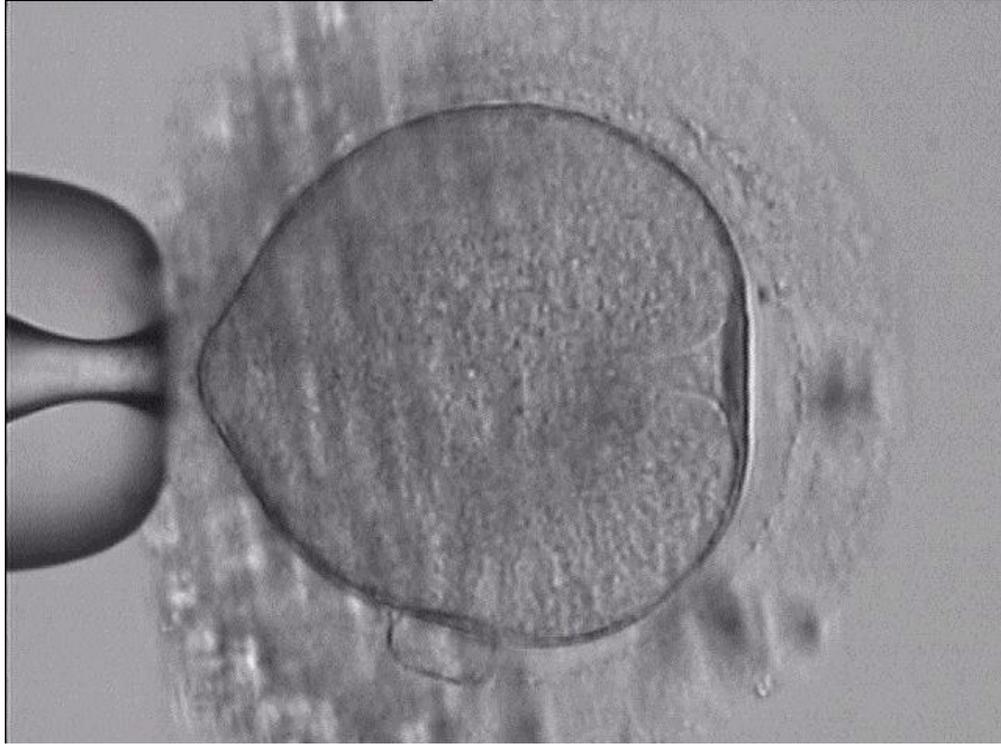


Fig. 30 Ovocito con pequeño cono de inyección



Cada uno de estos marcadores han sido valorados como: 1 si es positivo, 0 si es intermedio y -1 si es negativo, por lo que al tener 9 marcadores tendremos un intervalo entre +9 a -9.

Por ello hemos creado una clasificación acumulativa basada en cada uno de estos marcadores y catalogado a los ovocitos de la siguiente forma:

Ovocito tipo **A**: valor desde + 9 a +5

Ovocito tipo **B**: valor desde +4 a 0

Ovocito tipo **C**: valor desde -1 a -5

Ovocito tipo **D**: valor desde -6 a -9



6. MARCADORES DE CALIDAD EN EL CIGOTO (Día 1 del desarrollo)

Para establecer la calidad de los cigotos es importante tener en cuenta los pronúcleos y los corpúsculos polares.

6.1 Pronúcleos

Los pronúcleos deben ser dos, estar situados juntos y ser del mismo tamaño.

Los cigotos se evaluaron de acuerdo a los criterios basados en el número y la distribución de los nucléolos en el pronúcleos, según *Tesarik J y Greco E 1999*). (Fig. 31)

El patrón pronuclear de los cigotos se consideró el más importante para elegir los embriones más viables, de acuerdo con los datos publicados previamente (*Tesarik J y Greco E 1999; Tesarik J y col. 2000; Balaban B y col. 2004*).

Este patrón determina los rangos normales de la variabilidad de los pronúcleos, definido por el análisis de los cigotos que han sido transferidos y que tienen un 100% de implantación (modelo 0). El bloqueo de los embriones procedentes del modelo 0 es tan sólo del 8.5% en comparación con el 31.6, 21.9, 30, 20.5, y 24.1 % de los modelos del 1 al 5 respectivamente. La tasa de embarazo clínico en el modelo 0 llega al 50% en relación con el 9% en los demás ciclos donde se ha transferido embriones de los otros modelos.

El sistema de puntuación se ha simplificado agrupando todos los patrones anormales (*Tesarik J y col. 2000*), por lo que todos los embriones fueron asignados a uno de los dos grupos: embriones de buena morfología y embriones de mala morfología.



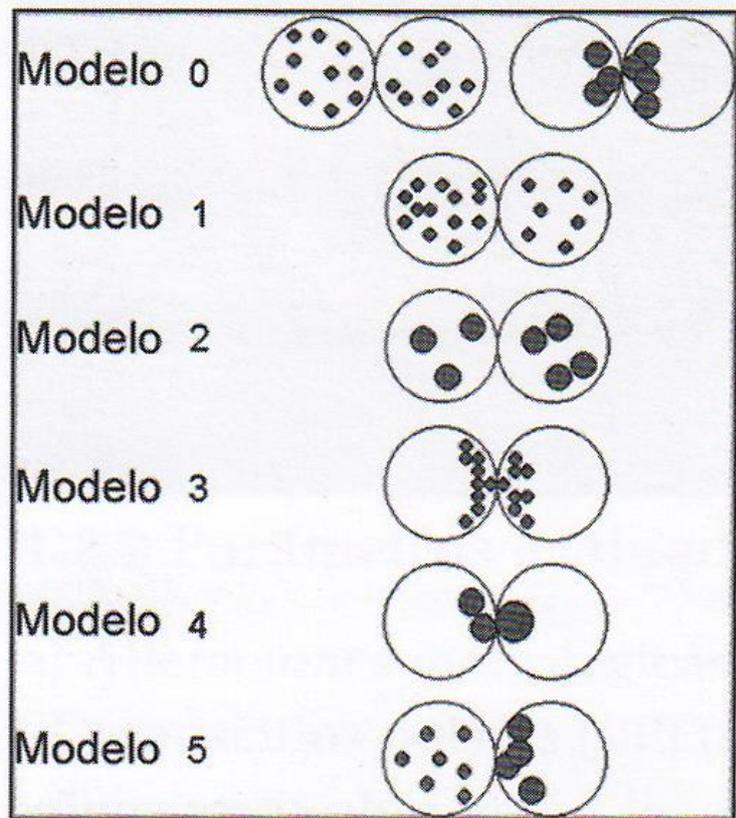


Fig. 31 Modelo de gradación pronuclear propuesto de Tesarik J y Greco E 1999.

6.2 Corpúsculos polares

Los corpúsculos polares deben ser dos, pueden estar juntos o separados y no deben estar fragmentados (Fig. 32).



Fig. 32 Embrión en día 1 de desarrollo con dos pronúcleos y dos corpúsculos polares.



7. MARCADORES DE CALIDAD DE LOS EMBRIONES (Día 3 del desarrollo)

Los embriones han sido catalogados según el esquema de gradación de ASEBIR
(Asociación para el estudio de la biología de la reproducción) (Fig. 33).

ESQUEMA DE GRADACIÓN EMBRIONARIA EN D+2 Y D+3 ASEBIR

GRADO	Día	Nº de células ("→" paso de D+2 a D+3)	% Fragmentos	Simetría	Multinucleación	Otros
A	D+2	4	≤ 10%	EE ⁽¹⁾	NO	NORMAL
	D+3	7, 8				
B	D+2	5	> 10-25%	4 → 7 céls. NO EE D+3	NO	≤50% céls. con vacuolas pequeñas, o bien ZP anormal
	D+3	5 → 7 - 10 4 → 9, 10				
C	D+2	2, 3, 6	> 25-35%	2, 4, 8 céls. NO EE	1cél. bn D+2, o bien 1-2 céls. bn D+3 y el resto como Grado A ⁽²⁾	≤50% céls. con vacuolas grandes
	D+3	2, 3 → 6 - 9				
		6 → 8 - 10 6, 11, 12				
D	D+2	3 (NO EE), >6	> 35%	3 céls. NO EE en D+2	Cualquier otro tipo de multinucleación	>50% céls. con vacuolas pequeñas o grave alteración citoplásmica ⁽³⁾
	D+3	3 - 5, 1 más que en D+2				

Embriones Excluidos de la clasificación por probabilidad de implantación prácticamente nula: Falta de división en 24h; >50% de Fragmentación; Vacuolas grandes en >50% de las células; Combinación de >2 anomalías propias de grado D

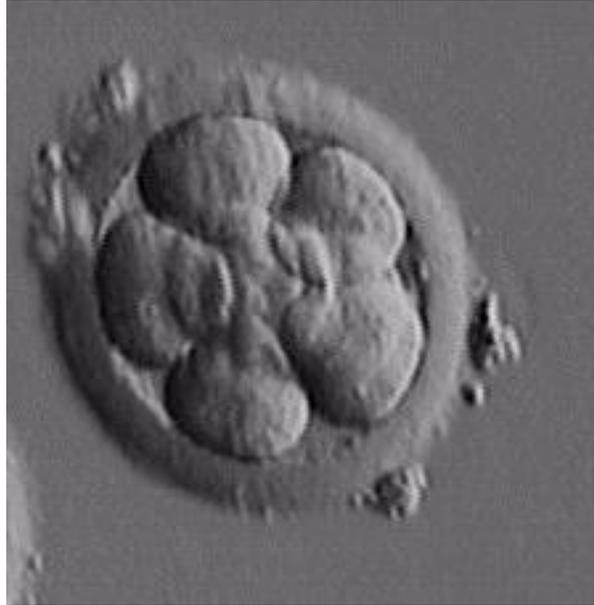
Fig. 33 Esquema de gradación embrionaria de D+2 y D+3 ASEBIR.

- (1) "EE" = Estadio-específico.
- (2) "bn" = Binucleada. Excepción a la regla: cualquier multinucleación conlleva clasificar como D.
- (3) Por ejemplo: anillo acitoplasmático muy evidente en D+3. Las vacuolas no se valoran. Excepción a la regla de no penalización por combinación de varias características negativas.

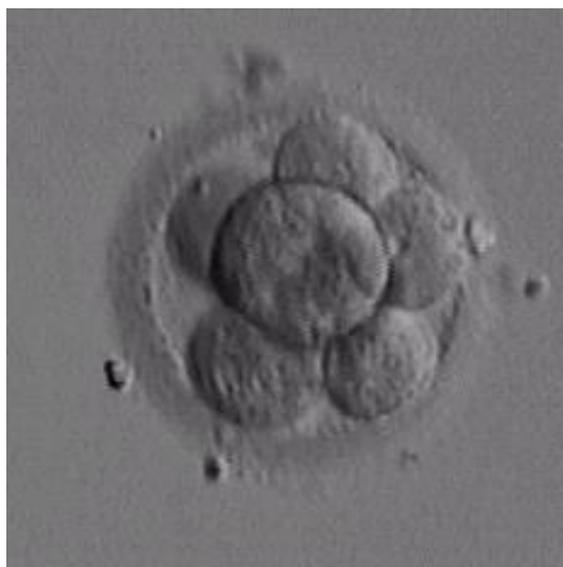


Ejemplos de embriones en D+3 clasificados con ASEBIR:

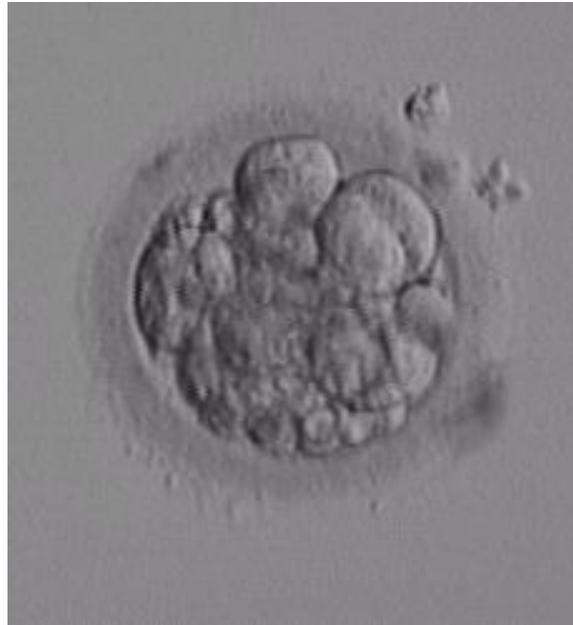
- **Embriones Tipo A**



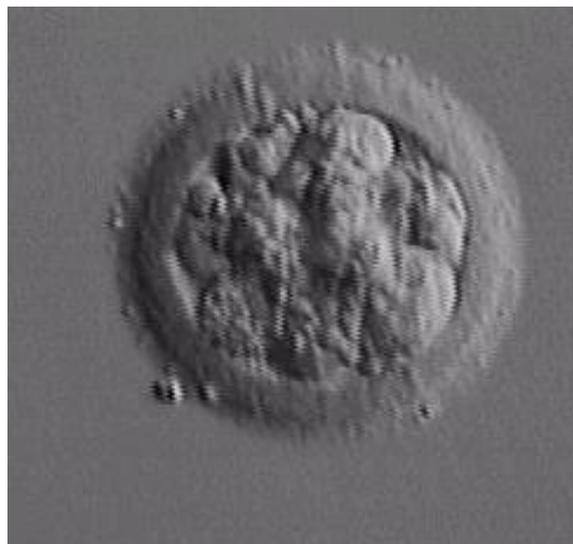
- **Embrión Tipo B**



- **Embrión Tipo C**



- **Embrión Tipo D**



8. CULTIVO EMBRIONARIO

El material utilizado es:

- Medio de cultivo embrionario hasta el día 3, G1 plus (*Vitrolife*).
- Medio de cultivo embrionario a partir del día 3 (más de 8 células), G2 plus (*Vitrolife*).
- Medio de cultivo para la transferencia, G2 plus (*Vitrolife*).
- Catéter de transferencia embrionaria, Cook ref. K-JETS-7019-SIVF .

La fecundación se evaluó 16-18 h después de ICSI, distinguiendo los embriones de buena y de mala calidad (véase la sección “Selección de embrión para la transferencia”).

Después de cambiarlos de medio el día de la fecundación, los embriones se cultivaron en este medio y en el día 2 o primer día de la división se vuelve a cambiar a medio nuevo hasta el día 3 después de la ICSI. En el momento del cambio de medio (día 2), se vuelve a evaluar la calidad del embrión (véase la sección “Selección de embrión para la transferencia”). La transferencia de embriones se realizó 3 días después de la ICSI con el uso del catéter de transferencia embrionaria y con un seguimiento de ecografía transabdominal. Se transfirieron de uno a tres embriones en cada ciclo. En los casos en los que fue conveniente, los embriones no transferidos, se congelaron para su posterior transferencia. Este estudio, sin embargo, sólo se refiere a las transferencias de embriones frescos.



9. SELECCION DE LOS EMBRIONES PARA LA TRANSFERENCIA

La selección de los embriones se realiza en el momento previo a la transferencia estableciendo una comunicación con la paciente y quedando fijada la cantidad de estos a transferir, según cada caso particular.

Para elegir los embriones de la mejor calidad posible se efectuaron 3 evaluaciones sucesivas para cada uno de ellos: la calidad del ovocito correspondiente (según indicamos en la sección 5 de Material y Métodos), la calidad del cigoto resultante de su fecundación (según mostramos en la sección 6 de Material y Métodos), y la calidad del embrión el día de la transferencia (según criterios mostrados en la sección 7 de Material y Métodos).

La calidad embrionaria fue evaluada en dos ocasiones, primero en el momento del cambio de medio, 2 días después de la ICSI y el segundo 10-30 min. antes de la transferencia al útero, 3 días después de la ICSI.

Los embriones que tenían más de 3 células en día 2 y más de 6 células en día 3, y que mostraron <10% de fragmentación celular se consideraron de buena calidad y fueron seleccionados para la transferencia.

En una parte de este estudio (Efecto de GH sobre la calidad embrionaria) se utilizó también un análisis morfocinético de la división embrionaria, realizado en un incubador cinematográfico capaz de grabar imágenes sucesivas de embriones en intervalos variables de tiempo (Primovision Vitrolife) (Fig.34)

Antes de la transferencia se realiza una ecografía vaginal para medir la distancia desde la entrada en el cuello del útero hasta su destino, con el objeto de depositar los embriones en la zona donde el espesor del endometrio sea mejor.




Primo Vision^{EVO}
Time Lapse Embryo Monitoring System



Elapsed time: 1 Day, 13:30

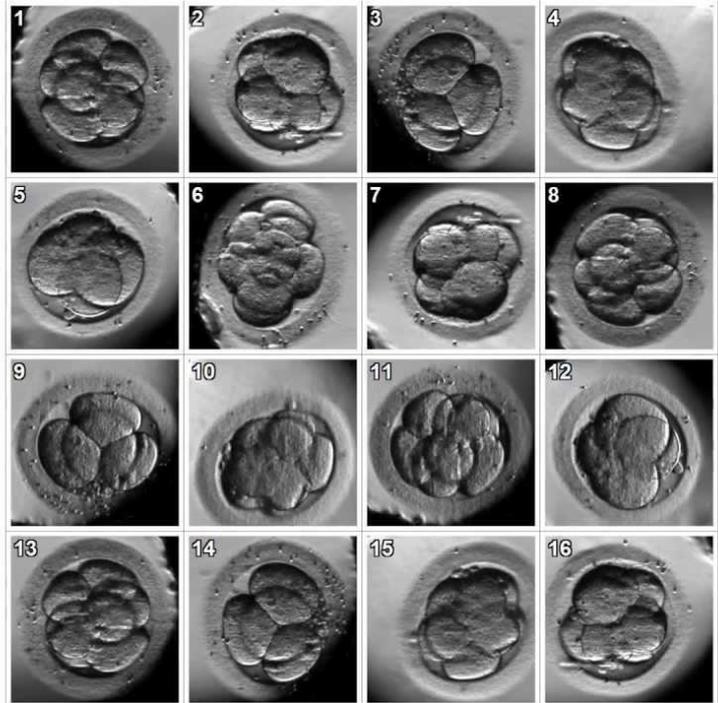


Fig. 34 Sistema de monitorización time lapse de la evolución embrionaria.



10. ADMINISTRACIÓN DE SUPLEMENTOS DE LA FASE LÚTEA

Independientemente de si se utilizó un agonista de la GnRH como apoyo o no de la fase lútea, a todas las mujeres se les dio 4 mg/día de Estradiol (*Progynova*; *Schering*) y 400 mg/día de progesterona vía vaginal (*Utrogestan*; *Laboratoires Besins-Iscovesco*) diarios a partir del día de la punción ovocitaria y durante 17 días. Además, todas las mujeres recibieron una inyección de 250 µg de HCG Recombinante (*Ovitrelle*) el día de la transferencia de los embriones.



11. DETERMINACIONES HORMONALES

A todas las pacientes se les realizan varias determinaciones hormonales, en el día de la transferencia embrionaria, a los 7 y a los 14 días posteriores.

Las concentraciones séricas de 17β -E₂, progesterona y β -HCG se determinaron con el uso de kits comerciales de inmunoensayo enzimático (*Diagnostic Product Corporation, Los Angeles, CA, EE.UU.*).

Los coeficientes de variación (CV) intraensayo e interensayo fueron, respectivamente, 3,8 y 5,6% para E₂, 3,7 y 4,0% para la progesterona, y el 3,5 y el 4,1% para β -HCG. Todas las mediciones se tomaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante.



12. ANALISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

En el efecto de GH durante la estimulación sobre la calidad de ovocitos, cigotos y embriones, incluyendo las tasas de embarazo clínico, parto, implantación clínica y nacimiento.

El análisis se hizo con el programa SPS, versión 16.0, para Microsoft Office (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Los valores cuantitativos se presentaron como media \pm desviación estándar (SD). Los valores cualitativos están expresados como porcentajes.

Diferencia entre diferentes grupos se analizaron por el test-t de Student, en cuanto a los valores cuantitativos, y por el test X^2 , en cuanto a los valores cualitativos (porcentajes). Todas las pruebas fueron de dos colas. Los valores de $P < 0.05$ se consideraron como estadísticamente significantes.

En el efecto de GH sobre receptividad uterina.

Los análisis estadísticos se realizaron en SPSS 20 para Macintosh (IBM, Chicago, IL). La mayoría de las variables continuas (por ejemplo, la edad de los pacientes y el número total de embriones) se distribuyeron normalmente. Esas variables continuas que no se distribuyeron normalmente (por ejemplo, el grosor del endometrio) se modificaron. El análisis de varianza de una vía se utilizó para explorar las diferencias en la distribución de las características de línea de base y ciclo entre los grupos. En caso de diferencias significativas entre los grupos, se utilizó la prueba post hoc de Tukey para explorar las diferencias entre los subgrupos.

Se realizó una regresión logística para analizar las diferencias en las medidas del resultado entre los pacientes con GH y los controles, en los que la edad del paciente, la edad de la pareja, y el número de embriones transferidos se ingresaron como factores de confusión.

Se utilizó la regresión logística binaria para determinar los odds ratios (OR) y los intervalos de confianza del 95% (C.I.) de tener mejores resultados en el grupo de pacientes



con GH en comparación con el grupo sin GH. Estos análisis se ajustaron a la edad del paciente (modelo 1) y, además, a la edad de la pareja y al número de embriones transferidos (modelo 2).

En todos los análisis, el valor de p , 0,05 se consideró estadísticamente significativo.

En el efecto del agonista de la GnRH sobre la fase lútea

Las variables continuas se presentaron como medias \pm desviaciones estándar (DE) y se compararon mediante la prueba U de Mann-Whitney o la prueba de suma de rangos de pares combinados de Wilcoxon. Los valores proporcionales se compararon mediante chi-cuadrado de Pearson o chi-cuadrado de McNemar. $P < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo.



RESULTADOS



1. EFECTO DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO SOBRE LA CALIDAD DE LOS OVOCITOS Y EMBRIONES.

Los dos grupos del estudio no muestran diferencias significativas entre ellos respecto a las edades de las mujeres, índice de masa corporal, tiempo y causa de infertilidad, número de folículos antrales y valor de la hormona antimulleriana (AMH) (Tabla 1).

En la Tabla 2 se observa que la administración de la hormona de crecimiento (GH) recombinante durante la estimulación ovárica sobre la calidad ovocitaria, no influye en la obtención del número total ovocitos maduros (Metafase II) en mujeres tratadas y no tratadas, aunque si existe un mayor porcentaje de los ovocitos de buena calidad tipo A ($p<0.05$) y reducción de los de mala calidad tipo D ($p<0.01$), aumentando el tipo B y disminuyendo el tipo C, pero no significativamente.

Del mismo modo, se han analizado el efecto de la GH sobre la calidad de los cigotos obtenidos tras la fecundación de los ovocitos anteriores (Tabla 3). Después de la fecundación con espermatozoides normales, se observan un mayor número de cigotos provenientes de la estimulación con GH ($p<0.05$), en comparación con el grupo control y sobretodo un mayor número de cigotos con un patrón normal de distribución de nucléolos en el interior de los pronúcleos ($p<0.01$).

Además, el análisis morfocinético del desarrollo embrionario entre el día de la fecundación y el día de la transferencia de los embriones en el útero, también demuestra que se obtienen más embriones provenientes de las estimulaciones con la adicción de GH que sin ella (5,9 versus 4,7)($p<0.05$), y un aumento significativo de los embriones de Tipo A (3,2 versus 1,4) (<0.01), mientras que disminuyen el porcentaje de embriones Tipo C y D , en comparación con embriones del grupo control ($p<0.05$) (Tabla 4).

El efecto del tratamiento con GH durante la estimulación ovárica sobre la calidad de los embriones transferidos se muestra en la Tabla 5. Se observa que no hay diferencias significativas en cuanto al número de embriones transferidos por paciente, pero si existen



diferencias significativas ($p < 0.05$) en cuanto a la calidad de los embriones transferidos, siendo mayor el número de embriones Tipo A transferidos en el grupo tratado con GH, respecto al grupo control (1.8 versus 1.0) ($p < 0.05$). Los embriones transferidos Tipo B y C son significativamente menores ($p < 0.01$), en las pacientes tratadas con GH.

La Tabla 6 muestra el efecto del tratamiento con GH sobre la tasa de embarazos clínicos (número de embarazos clínicos o saco con embrión con actividad cardíaca dividido por el número de transferencias embrionarias) y tasa de partos, siendo ambos porcentajes más elevados significativamente ($p < 0.01$) en el grupo de mujeres tratadas con GH.

En la Tabla 7 se muestra el efecto del tratamiento con la GH sobre la implantación clínica y de nacimientos. Los resultados muestran mayores porcentajes de implantación clínica y de nacimientos ($p < 0.01$), en mujeres tratadas con GH respecto a las no tratadas.



Tabla 1. Características de base de las pacientes tratadas y no tratadas con GH ¹.

Tratamiento	Edad (Años)	IMC (kg/m ²)	Tiempo de infertilidad (Años)	NFA	AMH suero (ng/ml)
Sin GH	34.5±4.9	21.9±4.2	3.9±1.8	6.8±4.1	2.3±1.4
Con GH	34.8±4.1	22.2±4.3	4.1±2.1	6.4±4.0	2.2±1.5
Valor de P	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05

¹ Valores numéricos son Media ± SD.
NFA: número de folículos antrales.

Tabla 2. Efecto del tratamiento con la GH durante la estimulación ovárica sobre la calidad de los ovocitos.

Ovocitos Metafase II recuperados por paciente ¹					
Tratamiento	Total	Tipo A	Tipo B	Tipo C	Tipo D
Sin GH	6.5±3.2 (100)	2.9±2.7 (45)	1.6 ±1.4 (25)	1.0±1.3 (15)	1.0±1.3 (15)
Con GH	6.9±2.9 (100)	4.1±2.9 (59)	1.7±1.7 (25)	0.8±0.9 (12)	0.3±0.6 (4)
Valor de P	>0.05	<0.05	>0.05	>0.05	<0.01

¹ Valores numéricos son Media ± SD.

Tabla 3. Efecto del tratamiento con GH durante la estimulación ovárica sobre la calidad de la fecundación de los cigotos.

Cigotos con patrón pronuclear normal y anormal alcanzado por paciente ¹			
Tratamiento	Total	Patrón normal	Patrón anormal
Sin GH	4.6±2.5 (100)	0.6±0.8 (13)	4.0±2.0 (87)
Con GH	5.8±2.5 (100)	1.4±1.2 (24)	4.4±2.4 (76)
Valor de P	<0.05	<0.01	>0.05

¹ Valores numéricos son Media ± SD.



Tabla 4. Efecto del tratamiento con la GH durante la estimulación ovárica sobre la calidad de los embriones.

Embriones conseguidos por paciente ¹					
Tratamiento	Total	%Tipo A	%Tipo B	%Tipo C	%Tipo D
Sin GH	4.7±2.5 (100)	1.4±1.2 (30)	1.7±1.6 (36)	1.0±0.8 (21)	0.6±0.8 (13)
Con GH	5.9±2.4 (100)	3.2±2.1 (54)	1.9±1.4 (32)	0.6±0.8 (10)	0.3±1.6 (4)
Valor de P	<0.05	<0.01	>0.05	<0.05	<0.05

¹ Valores numéricos son Media ± SD.

Tabla 5. Efecto del tratamiento con la GH durante la estimulación ovárica sobre la calidad de los embriones transferidos.

Embriones transferidos por paciente ¹				
Tratamiento	Total	Tipo A	Tipo B	Tipo C
Sin GH	2.4±0.6 (100)	1.0±1.1 (42)	0.9±0.7 (37)	0.5±0.7 (21)
Con GH	2.2±0.6 (100)	1.8±0.8 (82)	0.3±0.6 (14)	0.1±0.1 (4)
Valor de P	>0.05	<0.05	<0.01	<0.01

¹ Valores numéricos son Media ± SD.

Tabla 6. Efecto del tratamiento con la GH sobre la tasa de embarazos clínicos y de partos.

Tratamiento	Nº de transferencias de embriones	Embarazos clínicos	Partos	Tasa de embarazos clínicos	Tasa de Partos
Sin GH	46	5	3	10.9%	6.5%
Con GH	52	22	18	42.3%	34.6%
Valor de P				<0.01	<0.01



Tabla 7. Efecto del tratamiento con la GH sobre la implantación clínica y de nacimientos.

Tratamiento	Embriones transferidos	Sacos gestacionales con latido cardiaco positivo	Niños nacidos	Tasa de implantación clínica	Tasa de nacimientos
Sin GH	110	5	3	4.5%	2.7%
Con GH	104	22	18	21.2%	17.3%
Valor de P				<0.01	<0.01



2. EFECTO DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO SOBRE LA RECEPTIVIDAD UTERINA

En la Tabla 8, se observa que los tres grupos del estudio no muestran diferencias significativas entre ellos respecto a las edades de las mujeres y de sus parejas masculinas. Las mujeres del grupo con GH tienen una edad de 42.2 ± 4.7 años, mientras que las del grupo sin GH tienen un rango de edad de 42.4 ± 3.7 años, el grupo control tiene edades de 43.8 ± 2.5 años. Los maridos tienen 44.7 ± 7.4 años en el grupo con GH, 45.1 ± 5.4 años en el grupo sin GH y 47.1 ± 5 años en el grupo control. Los tres grupos son homogéneos en relación a la duración y causa de su infertilidad, así como en el índice de masa corporal y el porcentaje de fumadores (Tabla 8). Ningún paciente abandonó el estudio ni hubo que excluirlo.

En la Tabla 9, se observa que las mujeres tratadas con GH desarrollaban un endometrio significativamente más espeso comparado con las del grupo que no recibieron GH ($p < 0.05$). De hecho, este grupo tiene valores similares comparándolos con el grupo control positivo (9.3 ± 1.5 mm y 9.4 ± 1.7 mm, respectivamente). El grupo que no recibió la GH tuvieron un espesor del endometrio inferior 8.6 ± 1 mm.

Del mismo modo, se observa en las pacientes tratadas con GH un aumento significativo ($p < 0.001$), en las tasas de embarazo y de nacimiento en comparación con el grupo de mujeres sin GH, recibiendo el mismo número de embriones provenientes de los ovocitos donados de la misma calidad y cuyo útero fue preparado mediante los mismos protocolos excepto la omisión de GH. (Tabla 9).

Al analizar los tres grupos también encontramos diferencias significativas ($p < 0.001$), en los porcentajes de embarazo, de partos y de niños nacidos vivos, según se muestra en la Tabla 9. El análisis pediátrico neonatal no ha detectado ninguna anomalía en los niños nacidos.

En la Tabla 10 se expone un resumen de las tasas de éxito del tratamiento en los tres grupos: pacientes con RIF sin GH, pacientes con RIF y con GH y pacientes control sin RIF



y sin GH. Se puede observar que las pacientes del grupo con RIF en los que no se usó GH tuvieron tasas de éxito del tratamiento inferiores los otros dos grupos, en términos generales, es decir en tasa de embarazo, tasa de implantación, tasa de embarazo en curso, tasa de implantación en curso, tasa de nacimientos vivos y tasa de bebés nacidos.

Al comparar las posibilidades de éxito del tratamiento entre mujeres infértiles con GH frente a las mujeres sin GH, existe una mayor tasa de β HCG positiva ($p < 0.001$), latido cardiaco positivo ($p < 0.002$) y nacimientos vivos ($p < 0.002$), en mujeres tratadas con GH ($p < 0.001$) (Tabla 11 y Fig.35).

Estas mejoras en los resultados de los tratamientos con GH deben ser posibles gracias a la administración de la GH ya que se utilizaron solo ovocitos de donante en las que no se había usado la GH.

Sin embargo, como se esperaba las tasas de éxito en el grupo de RIF con GH fueron algo menores en comparación al control positivo que era el grupo que se sometía a su primer tratamiento de donación de óvulos (Tabla 10). No se detectó ninguna anomalía en los niños recién nacidos, ni durante su primer año de vida.



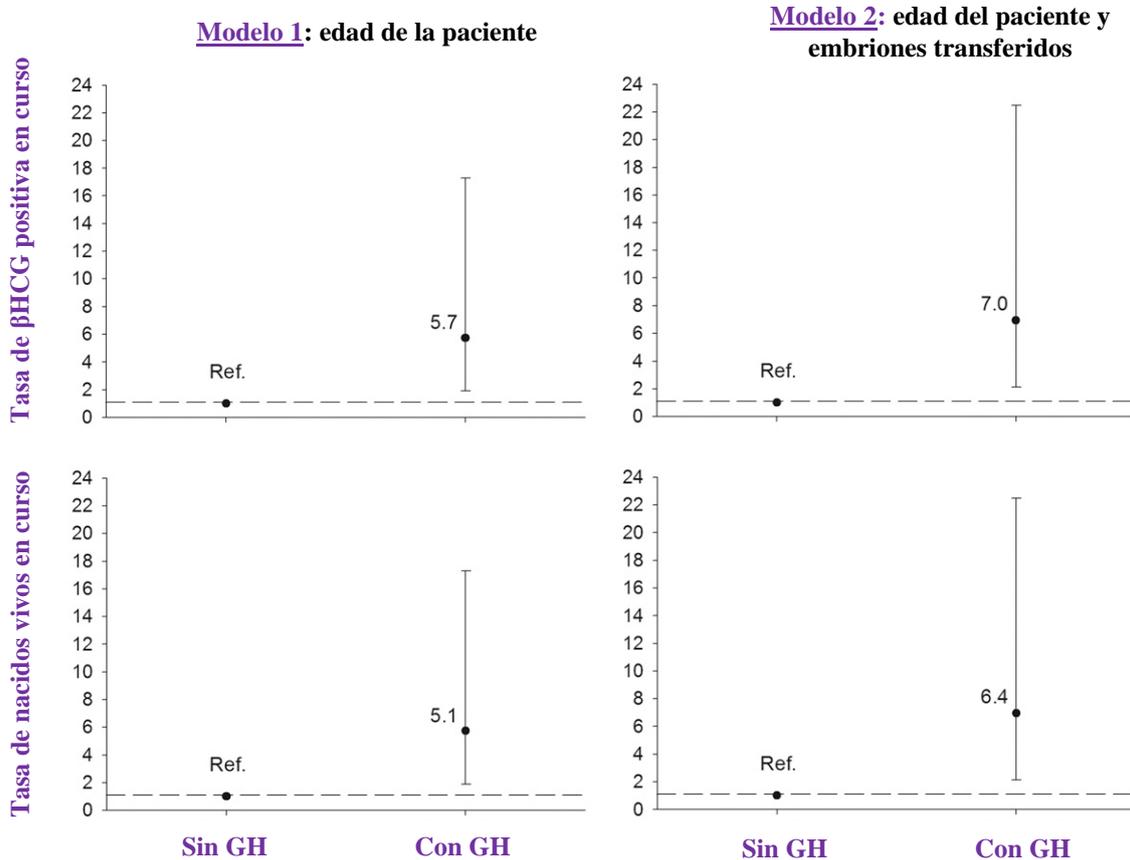


Fig. 35 Tasas de un mejor resultado del tratamiento después de la administración de GH. Las pacientes sin GH se establecieron como grupo de referencia en los análisis y se representan gráficamente mediante la línea discontinua. Las mujeres con RIF tratadas con GH en el programa de ovocitos donados demuestran 5 veces más probabilidades de obtener una prueba de embarazo positiva y un parto vivo que las mujeres en el grupo sin GH.



Tabla 8. Características de base de las pacientes tratadas, no tratadas con GH y grupo control sobre la receptividad uterina¹.

Tratamiento	Edad (Años)	IMC (kg/m ²)	Tiempo de infertilidad (Años)
Sin GH	42.4±3.7	22.1±3.2	4.9±2.8
Con GH	42.2±4.7	21.8±4.4	4.8±3.1
Control positivo	43.8±2.5	22.0±3.1	4.7±2.9
Valor de P	>0.05	>0.05	>0.05

¹ Valores numéricos son Media ± SD.

Tabla 9. Características clínicas de los tres grupos de estudio (n= 35 en cada grupo) en ciclos de ovodonación.

	Pacientes con GH	Pacientes Sin GH	Control positivo	Valor P
Media del espesor endometrial (mm)	9.3 (1.5)	8.6 (1.0)	9.4 (1.7)	<0.05 ^b
Nº Embriones obtenidos	7.9 (2.2)	8.2 (1.5)	8.3 (1.3)	0.643
% Embriones transferidos				<0.05 ^a
1	2 (5.7%)	0 (0%)	5 (14.3%)	
2	26 (74.3%)	27 (77.1%)	27 (77.1%)	
3	7 (20%)	8 (22.9%)	3 (8.6%)	
% βHCG positiva	19 (54.3%)	6 (17.1%)	26 (74.3%)	<0.001 ^{a,b}
% Latido cardiaco positivo	18 (51.4%)	6 (17.1%)	25 (71.4%)	<0.001 ^{a,b}
% Nº de sacos				<0.001 ^{a,b}
1	13 (37.1%)	4 (11.4%)	17 (48.6%)	
2	6 (7.1%)	2 (5.7%)	9 (25.7%)	
% Partos	18 (51.4%)	6 (17.1%)	24 (68.6%)	<0.001 ^{a,b}
% Bebés nacidos				<0.001 ^{a,b}
1	14 (40.0%)	5 (14.3%)	16 (45.7%)	
2	4 (11.4%)	1 (2.9%)	8 (22.9%)	

^aDiferencias significativas entre pacientes sin GH vs. Control positivo en una comparación múltiple en el test post hoc.

^bDiferencias significativas entre pacientes sin GH vs. Pacientes con GH en una comparación múltiple en el test post hoc.



Tabla 10. Resumen de las tasas de éxito del tratamiento en los grupos estudiados.

	Pacientes sin GH (n=35)	Pacientes con GH (n=35)	Control positivo (n=35)
Tasa de embarazo (n° de mujeres con β hCG positiva)	17.1%	54.3%	74.3%
Tasa de implantación (n° sacos embrionarios)	10.3%	33.3%	51.5%
Tasa de embarazo en curso (n° embarazos con actividad cardiaca positiva)	17.1%	51.4%	71.4%
Tasa de implantación en curso (n° fetos vivos – 20 semanas)	7.7%	24.0%	36.8%
Tasa de aborto (n° de abortos)	0% (0)	5.3%	3.8%
Tasa de nacimientos vivos (n° de nacimientos vivos)	17.1%	51.4%	68.6%
Tasa de bebés nacidos (n° de bebés nacidos)	9.0%	29.3%	47.1%

Tabla 11. Las posibilidades de éxito del tratamiento entre mujeres infértiles con administración de GH durante el tratamiento de FIV frente a mujeres sin la administración de la GH.

	Valor de P	Odds Ratio	Intervalo de confianza
βhCG positiva	0.001	6.9	2.2 a 22.5
Latido cardiaco positivo	0.002	6.4	2.0 a 20.9
Nacimientos vivos	0.002	6.4	2.0 a 20.9

Controlado /Ajustado según la edad de la paciente, edad del marido y número de embriones transferidos.



3. EFECTO DE LA GnRH SOBRE LA RECEPTIVIDAD UTERINA

En este estudio de los dos grupos, se han comparado casos y controles adecuadamente pareados. Las pacientes tratadas con protocolos de estimulación con agonista de la GnRH en la fase lútea y las no tratadas no difieren en sus características demográficas básicas ni en sus ciclos de estimulación de la ovulación.

En la Tabla 12 se muestran la comparación entre la cantidad de ovocitos recuperados, fertilizados y desarrollo embrionario en dos tentativas sucesivas de FIV con agonista de la GnRH (25 pacientes) y sin agonista de la GnRH (25 pacientes), no existiendo diferencias significativas en ambos grupos, en ninguno de los parámetros medidos.

Las concentraciones de progesterona en sangre, medidas el día de la transferencia de embriones, no fueron significativamente diferentes entre las pacientes de los dos grupos (Tabla 13). Sin embargo, 14 días después de la transferencia de embriones, las concentraciones de progesterona fueron claramente mayores en el grupo tratado con el agonista de la GnRH en la fase lútea ($p < 0.001$) (Tabla 13).

Por otra parte, aunque la diferencia de la concentración de progesterona entre las pacientes tratadas y aquellas no tratadas con el agonista de GnRH fue más notable en aquellas pacientes que quedaron embarazadas ($p < 0.002$), la concentración de la progesterona después de la administración del agonista de GnRH fue significativamente mayor incluso en las pacientes que no quedaron embarazadas ($p < 0.007$) (Tabla 14).

A pesar de que en las dos tentativas consecutivas de FIV se obtuvieron un número similar de embriones para transferir (Tabla 15) y de calidades similares (Tabla 12), encontramos diferencias entre los porcentajes de embarazo (β GCH positiva) ($p < 0.001$) y embarazo clínico (embarazo evolutivo) ($p < 0.001$) (Tabla 15), de tal forma que las tasas de embarazo en las pacientes tratadas con el agonista de la GnRH aumentaron significativamente en relación a las que no tuvieron ese soporte (Tabla 15).

Todos los embarazos clínicos dieron lugar al nacimiento de bebés sanos.



Tabla 12. Comparación entre cantidad de ovocitos recuperados, fertilizados y desarrollo embrionario en dos tentativas sucesivas de FIV con agonista de la GnRH (25 pacientes) y sin agonista de la GnRH (25 pacientes).

Agonista GnRH	Total de ovocitos ^a	Ovocitos inyectados ^a	Cigotos normales ^a	Total embriones ^a	Embriones de calidad ^a
No	9.8 ± 3.7	8.2 ± 2.9	6.9 ± 2.2	6.4 ± 2.0	4.0 ± 1.2
Si	10.0 ± 3.7	8.5 ± 2.9	7.0 ± 2.5	6.6 ± 2.1	4.2 ± 1.2
Valor p ^b	NS	NS	NS	NS	NS

^a Valores por desviación estándar.

^b Los valores de p mayores de 0.05 se consideraran no significativos, NS.

Tabla 13. Comparación de los niveles de progesterona en las dos tentativas sucesivas de FIV con agonista de la GnRH y sin agonista de la GnRH como soporte de la fase lútea, realizado en 25 pacientes.

Agonista de la GnRH	Progesterona en suero (ng/ml) ^a	
	Día de la transferencia embrionaria ^b	Día 14 de la transferencia embrionaria ^b
No	11.5 ± 2.7	13.3 ± 1.9
Si	12.0 ± 2.4	38.2 ± 14.6
Valor de p ^b	NS	<0.001

^a Valores por desviación estándar.

^b Los valores de p mayores de 0.05 se consideraran no significativos, NS.



Tabla 14. Comparación de los niveles de progesterona en las dos tentativas sucesivas de FIV con agonista de la GnRH y sin agonista de la GnRH como soporte de la fase lútea, realizado en pacientes (n=12) en los que se había conseguido embarazo con el agonista de la GnRH (n=12) y sin el agonista (n=10). Las 3 pacientes en las que se consiguió embarazo en las dos tentativas no se han incluido.

Agonista de la GnRH	Progesterona en suero del día 14 de la transferencia embrionaria (ng/ml) ^a	
	Pacientes embarazadas	Pacientes no embarazadas
No	14.0 ± 1.8	12.4 ± 1.6
Si	45.4 ± 12.0	25.9 ± 7.7
Valor de p	<0.002	<0.007

^a Valores por desviación estándar.

Tabla 15. Comparación de porcentajes de los embarazos y embarazos clínicos en las dos tentativas sucesivas de FIV con agonista de la GnRH y sin agonista de la GnRH como soporte de la fase lútea, realizado en 25 pacientes.

Agonista de la GnRH	Embriones transferidos por tentativa ^a	Embarazos ^b	
		βHCG positiva	Embarazo evolutivo
No	2.1 ± 0.5	3 (12%)	0 (0%)
Si	2.2 ± 0.4	15 (60%)	12 (48%)
Valor de p ^c	NS	<0.001	<0.001

^a Valores por desviación estándar.

^b Número (%) de casos.

^c Los valores de p mayores de 0.05 se consideraran no significativos, NS.



DISCUSIÓN



Desde el primer éxito de la fecundación in vitro (FIV) (*Steptoe PC y Edwards RG 1978*) han pasado más de 40 años. Durante este tiempo, la FIV ha pasado de ser una indicación marginal, reservada a un limitado grupo de mujeres afectada por una obstrucción de las trompas uterinas, a convertirse en una herramienta utilizada en la mayoría de los casos de infertilidad, tanto del origen femenino como masculino (*Tesarik J 2017*).

A pesar de esta espectacular expansión, existen varios aspectos de la FIV que no han recibido la atención suficiente (*Gleicher N y Barad DH 2019*). La aplicación, a veces demasiado precipitada, de nuevas modificaciones de diferentes métodos utilizados en la FIV, tanto en su parte clínica como en la del laboratorio, ha creado varias incógnitas en cuanto al impacto de dichas modificaciones sobre la calidad de los embriones y la receptividad del útero para su anidación.

Consecuentemente, resulta algunas veces difícil explicar fracasos repetidos de las tentativas de FIV. Aún peor, varios estudios, realizados con grandes números de casos, muestran que la FIV está asociada con un aumento significativo, aunque mínimo, de la frecuencia de varias anomalías del embarazo, como pre-eclampsia o anomalías de la placenta (*Rahu K y col. 2019*), y de la descendencia, como anomalías cromosómicas (*Tesarik J 1995*), prematuridad de los bebés nacidos (*Dunietz GL y col. 2015*) o deficiencias intelectuales (*Hansen M y col. 2018*).

Aunque algunas de estas irregularidades están relacionadas con la edad elevada y las anomalías de los gametos de los padres, así como la frecuencia relativamente alta de embarazos múltiples, existen datos que implican directamente varios factores de las mismas técnicas (*Menezo Y y col. 2019*). Si un factor negativo es demasiado intenso, para que los mecanismos de autocorrección embrionaria puedan reparar sus consecuencias, resulta un fracaso de implantación o un aborto espontáneo. Por otro lado, si la autocorrección salva al embrión pero no llega a reparar los daños producidos de una manera completa, puede resultar un feto y niño con diferentes anomalías.

Los estudios presentados en esta tesis están enfocados en dos factores importantes que determinan el desarrollo normal del embarazo: la calidad ovocitaria y la receptividad uterina para la anidación de los embriones. En cuanto a la calidad ovocitaria se ha



estudiado el efecto de la GH. En lo que concierne la receptividad uterina, y se analizaron los efectos de la GH, administrada en la fase proliferativa del desarrollo del endometrio así como del agonista de GnRH administrado en la fase secretora.

1. EL EFECTO DE LA GH SOBRE LA CALIDAD OVOCITARIA Y LA RECEPTIVIDAD UTERINA

Se sospechaba la existencia de un efecto de la GH sobre la calidad ovocitaria, desde que un estudio demostró una relación positiva entre la concentración de GH en el líquido folicular, aspirado mediante la punción folicular, y la calidad de los embriones generados por los respectivos folículos (*Mendoza C y col. 2002*).

Posteriormente se ha descubierto que la concentración de GH disminuye considerablemente en el líquido folicular de mujeres de más de 40 años de edad y que la administración de la GH, durante la estimulación ovárica, mejora las tasas de parto y de nacimiento en este grupo de mujeres (*Tesarik J y col. 2005*).

En cuanto a las mujeres más jóvenes con una mala respuesta a la estimulación ovárica, los resultados publicados en diferentes estudios son contradictorios. Algunos autores han encontrado una mejora de resultados clínicos de FIV en pacientes entre 30 y 40 años estimuladas con la GH durante la estimulación con gonadotropinas (*Homburg R y col. 1988; Owen EJ y col. 1991; Blumenfeld Z y col. 1991; Shoham Z y col. 1992; Blumenfeld, Z y Amit T 1995; Blumenfeld Z y Amit T 1996*), mientras que otros no han observado ninguna diferencia en comparación con las mujeres estimuladas sin la adición de la GH (*Dor J y col. 1995; Suikkari A y col. 1996*).

En el trabajo presente hemos comparado los marcadores de la calidad ovocitaria y embrionaria en un grupo de mujeres con 2 previos fracasos de FIV/ICSI y con edad entre 30 y 39 años. Además del supuesto efecto sobre la calidad de los ovocitos, otros resultados sugieren que los efectos de GH sobre las tasas de implantación y nacimiento puede ser también debidos a una mejora de la receptividad uterina por esta hormona (*Hull KL y Harvey S 2014; Moreira F y col. 2002; Xue-Mei W y col. 2016*). Los resultados presentados en esta tesis demuestran que la GH actúa sobre ambos niveles.



El análisis de la calidad morfológica de los ovocitos de mujeres entre 30 y 39 años de edad tratadas con la GH, durante la estimulación ovárica, demuestran una clara superioridad en comparación con las mujeres de la misma edad, cuya estimulación se llevó a cabo sin añadir la GH. A parte de este efecto sobre la calidad de los ovocitos, la GH también actúa al nivel del útero aumentando la receptividad del endometrio para la implantación de los embriones.

Nuestros resultados demuestran claramente que ambos efectos son independientes. De hecho, la mejora de la receptividad uterina para los embriones se alcanzó en mujeres receptoras de ovocitos en un programa de ovodonación. La GH se utilizó solamente en las mujeres receptoras y no en las mujeres donantes. Por lo tanto, queda claro que la hormona de crecimiento, aparte de mejorar la calidad de los ovocitos, ejerce efectos independientes sobre la receptividad uterina.

Queda por determinar cuáles son los mecanismos del efecto de la GH sobre los dos niveles. La GH es un agente polifacético y puede ejercer sus efectos mediante diferentes mecanismos, que son básicamente de dos tipos:

1. Un efecto directo mediante receptores específicos localizados sobre la superficie de las células diana.
2. Mediante la estimulación de la síntesis, en diferentes tejidos, del factor de crecimiento insulínico tipo 1, también conocido como somatomedina C o IGF-1. Ambos mecanismos parecen estar involucrados en los efectos de la GH en el sistema reproductor femenino, aunque la importancia de cada uno en los efectos, observados en este estudio, quedan por determinar. Se ha puesto en marcha un estudio multicéntrico para aclarar los mecanismos de los efectos de GH sobre diferentes aspectos de la fertilidad femenina y su potencial para corregir problemas a diferentes niveles de este complejo proceso.



2. MEJORA DE LA FASE LÚTEA MEDIANTE LA ADMINISTRACIÓN DE UN AGONISTA DE LA GnRH

Existen claras evidencias que sugieren la existencia de una deficiente fase lútea después de la transferencia de embriones, en ciclos estimulados con la HMG o FSH, independientemente de si es con un agonista de GnRH (*Macklon NS y Fauser BC 2000; Pritts EA y Atwood AK 2002*) o con un antagonista de la GnRH (*Beckers NG y col. 2003; Kolibianakis EM y col. 2003*), que se utilizan para la prevención de un aumento prematuro de LH.

Para resolver este problema, la mayoría de las clínicas utilizan algún tipo de soporte de la fase lútea, después de la transferencia de los embriones. Esto puede hacerse estimulando la secreción de progesterona por el cuerpo lúteo, con administración de HCG exógena o por suplementación directa de progesterona exógena (*Pritts EA y Atwood AK 2002*).

Los efectos de la administración del agonista de la GnRH en la fase lútea fueron evaluados en el contexto de la estimulación ovárica controlada por un antagonista de GnRH y utilizando la HCG para desencadenar la ovulación. Estos resultados apuntan a un efecto del agonista de GnRH sobre la producción de la progesterona por el cuerpo lúteo. Los resultados concernientes a los resultados clínicos de la ICSI, es decir, tasas de implantación clínica y de natalidad, confirman nuestras observaciones previas que demostraron un efecto directo del agonista de GnRH sobre los embriones. Conclusiones obtenidas en un protocolo de donación de ovocitos, donde los efectos sobre el cuerpo lúteo no fueron posibles a razón de la inhibición completa de la propia actividad ovárica de las pacientes receptoras de los óvulos donados (*Tesarik J y col. 2004*).

Consecuentemente, ambos mecanismos (efectos sobre el cuerpo lúteo y sobre el embrión) coinciden para aumentar la tasa de implantación clínica en pacientes tratados con los agonistas de la GnRH en la fase lútea. Esta situación conlleva un incremento del riesgo de embarazos múltiples en pacientes tratadas con administración de suplementos en esta fase lútea. Por lo tanto, podría ser interesante combinar la administración de agonistas de la GnRH en la fase lútea con la transferencia de un único embrión.



Además, en un estudio anterior (Tesarik J y col. 2006) hemos comparado los pacientes tratados con los dos protocolos de estimulación (protocolo largo con agonista de la GnRH y antagonistas de la GnRH) y recibiendo ambos el agonista de la GnRH en la fase lútea, con los del grupo control, obteniendo, en ambos tipos de estimulación, una mayor tasa de implantación embrionaria y de embarazo clínico en comparación con el correspondiente grupo de placebo. Además, comparando los pacientes tratados con los dos protocolos de estimulación (protocolo largo con agonista de la GnRH y antagonistas de la GnRH) y recibiendo ambos el agonista de la GnRH en la fase lútea, con los del grupo control, hubo un mejor resultado en los dos primeros casos y se demostró una tendencia hacia una mayor tasa de embarazo clínico en comparación con el correspondiente grupo control. No está clara la relación entre el protocolo de estimulación ovárica y el consecuente efecto de la administración de agonistas de la GnRH en la fase lútea, y sigue siendo un intrigante desafío para una mayor investigación, en el contexto de los continuos esfuerzos en la optimización del uso de antagonistas de GnRH en la estimulación ovárica (Fauser B y Devroey P 2005).

Los efectos beneficiosos de los agonistas de la GnRH en la fase lútea en estas variables, se alcanzó con un soporte extra de la fase lútea con esta hormona, además del tratamiento convencional con HCG, progesterona y E2, apoyados en la hipótesis de que los agonistas de GnRH ejercen un efecto beneficioso y directo sobre la implantación del embrión (Tesarik J y col. 2004). La hipótesis de la acción directa de los agonistas de la GnRH en el embrión (Tesarik J y col. 2004) se ve corroborada por la observación de niveles más altos de β -HCG en suero, en el grupo de pacientes que logró un embarazo (excluyendo los embarazos múltiples del análisis), después de la administración del agonista de la GnRH en la fase lútea, en comparación con el grupo control.

Existen estudios en los que destacaban que la GnRH incrementaba la HCG sérica en mujeres embarazadas (Iwashita M y col. 1993), presumiblemente por la acción de receptores placentarios de la GnRH (Lin L y col. 1995), y los resultados vinculantes en los casos de exceso de GnRH circulante por una sustancia indefinida GnRH -vinculante, posiblemente anticuerpos en pacientes con pérdidas precoces de embarazo (Siler-Khodr TM y col. 1997).



Sin embargo, los argumentos a favor de un efecto directo del agonista de la GnRH en el embrión no excluyen otros mecanismos de acción actuando en paralelo. El objetivo del estudio presentado en esta tesis, en comparación al modelo de la donación de ovocitos, ha sido el cuerpo lúteo y consecuente posibilidad de la acción del agonista de la GnRH en el mismo. De hecho, ya en el estudio publicado anteriormente (*Tesarik J y col. 2006*) se ha observado un aumento en las concentraciones séricas de E2 y de progesterona en la fase lútea, en los pacientes que recibieron una sola inyección del agonista de GnRH, 6 días después de ICSI, en comparación con los pacientes que recibieron control. Estos resultados se obtuvieron con ambos tipos de estimulación ovárica, agonistas y antagonistas de la GnRH (*Tesarik J y col. 2006*).

El mecanismo de acción de los agonistas de la GnRH en el cuerpo lúteo sigue siendo una cuestión controvertida. Los primeros estudios sugirieron que el tratamiento con agonistas de la GnRH, en la fase lútea (una o dos administraciones de 500 µg de busarelina), podría actuar como un agente luteolítico con fines anticonceptivos (*Lemay A y col. 1982, 1983*), supuestamente debido a la desensibilización del receptor de la GnRH en las células gonadotropas. De hecho, esto puede ser cierto para algunas dosis de agonista de GnRH, aunque la hipótesis de que la acción de los agonistas de la GnRH como anticonceptivo nunca ha sido confirmada definitivamente, y los intentos de inducir abortos tempranos con enormes dosis de un agonista de la GnRH superactivo han dado lugar a fracasos (*Skarin G y col. 1982*).

Recientemente, se realizaron una serie de estudios clínicos e informaron de las posibles consecuencias de una indiscriminada administración de agonistas de la GnRH en la fase lútea, con una sola excepción (*Herman A y col. 1992*), todos estaban de acuerdo en que la administración del agonista de la GnRH en la fase lútea no pusiera en peligro la continuación del embarazo resultante de los intentos en reproducción asistida, sino más bien para apoyar la implantación (*Golan A y col. 1990; Isherwood PJ y col. 1990; Ron-El R y col. 1990; Smitz J y col. 1991; Jackson AE y col. 1992; Balasch J y col. 1993; Elefant E y col. 1993; Har-Toov J y col. 1993; Weissman A y Shoham Z, 1993; Wilshire GB y col. 1993; Young DC y col. 1993; Gartner B y col. 1997*).



Cabe recordar que la utilidad del soporte de la fase lútea, en diferentes tipos de protocolo de estimulación ovárica es individual, más importante en ciertas mujeres que en otras. Como hemos publicado recientemente, una deficiencia de la fase lútea ocurre en algunas mujeres incluso en naturales y puede ser la causa principal de la infertilidad y de abortos espontáneos (*Tesarik J y col. 2019*). Lógicamente, estas mujeres están más propensas a problemas funcionales del cuerpo lúteo, en tratamientos FIV, que debilitan aún más el cuerpo lúteo, tanto por la misma estimulación ovárica como por la punción de los folículos para obtener ovocitos (*Mendoza-Tesarik R y col. 2019*).

Por otra parte, un pequeño estudio aleatorio sugirió que dosis bajas de agonistas de la GnRH (100 μ g de buserelina) podían ejercer un efecto estimulante sobre el cuerpo lúteo (*Pirard C y col. 2005*). Los datos actuales apoyan firmemente esta hipótesis. No se conoce si el aumento en la síntesis de E2 y progesterona en pacientes que recibieron agonistas de GnRH, en la fase lútea, está mediada por hormonas hipofisarias o es el resultado de una acción directa del agonista de la GnRH en el ovario. El fracaso para detectar un aumento cuantificable de la concentración sérica de LH, el primer día después de la administración de los agonistas de la GnRH, no es compatible con el papel de la hipófisis en estos casos, pero hay que recordar que un breve pico de LH, es suficiente para producir este efecto, y no puede ser detectado con este estudio.

Si el agonista de la GnRH estimula la producción placentaria de HCG, que es conocida por promover la secreción del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el principal implicado en el síndrome de hiperestimulación ovárica (*McClure N y col. 1994; Neulen J y col. 1995; Krasnow JS y col. 1996*), se plantea una cuestión acerca de la seguridad de la administración del agonista de la GnRH en la fase lútea, en pacientes con alto riesgo de hiperestimulación ovárica. Sorprendentemente, sin embargo, un estudio reciente realizado en ratas, ha demostrado que la administración de agonistas de GnRH, durante la fase lútea, reduce la expresión de VEGF y los receptores de VEGF, tanto en mRNA como en los niveles de proteína y disminuye la permeabilidad vascular en la hiperestimulación ovárica (*Kitajima Y y col. 2004*).

Por otra parte, la continuación en la administración de agonistas de la GnRH, en ciclos de reproducción asistida con bajas dosis de agonistas de la GnRH, han demostrado que



previenen el desarrollo del principio del síndrome de hiperestimulación en los pacientes en riesgo y en los que no se realizaría la transferencia de embriones sino que se criopreservarían (*Endo T y col. 2002*). El agonista de GnRH induce un aumento de la producción de HCG en el embrión en las primeras etapas de implantación que es probablemente demasiado baja para afectar significativamente a la síntesis de VEGF (*Kitajima Y y col. 2004*), que puede estar relacionado por la acción agonista de GnRH en el eje hipófisis-ovario, independiente de su efecto sobre el embrión temprano.

En este estudio, no hemos observado ningún caso de hiperestimulación grave que necesitara hospitalización. No hay pues, a priori, motivo por el que el agonista de GnRH se deba evitar como apoyo de la fase lútea en esta categoría de pacientes, aunque se recomienda precaución hasta tener una información más completa de cómo los efectos de los agonistas de la GnRH, en la fase lútea, afectan a los diferentes niveles del sistema reproductivo.

Por otra parte, se inmunolocalizó un receptor de GnRH en el endometrio murino (*Murdoch WJ 1995*), y también se detectó un receptor de la LH funcional en el útero humano (*Reshef E y col. 1990*). Una acción directa de los agonistas de la GnRH o de los agonistas de la GnRH inducidos por la LH en el tejido uterino puede ser el responsable de los efectos observados en la fase lútea.

Resumiendo, los resultados de este estudio prospectivo y aleatorio busca, en principio, los beneficios de la administración de los agonistas de la GnRH en la fase lútea para aumentar el potencial de implantación del embrión obtenido en el programa de donación de ovocitos, con protocolos de estimulación ovárica usando tanto agonistas como antagonistas de la GnRH, como prevención de la luteinización prematura. Este efecto fue particularmente evidente en los ciclos de estimulación que usaron los antagonistas de la GnRH. De este modo, estos datos corroboran la hipótesis de una acción directa del agonista de la GnRH en la implantación del embrión, así como en la secreción de la β HCG, que sugiere un efecto positivo directo o indirecto sobre la función del cuerpo lúteo.

Todas estas observaciones nos abren un camino más amplio en el uso de los agonistas de la GnRH como el soporte de la fase lútea, posiblemente en combinación con las técnicas



convencionales, como el empleo de HCG, E2 y progesterona, especialmente en ciclos con estimulaciones ováricas usando antagonistas de la GnRH. Sin embargo, hay que tener en cuenta los efectos que produce sobre la salud. Los datos presentes apuntan a otros estudios sobre este mecanismo de acción de los agonistas de la GnRH en la fase lútea. Serán necesarios estudios clínicos que determinen las dosis óptimas, el tiempo y frecuencia de la administración de los agonistas de la GnRH.



CONCLUSIONES



1. El uso de la hormona de crecimiento durante la estimulación ovárica de la paciente produce un aumento significativo del número de ovocitos de tipo A (calidad óptima).
2. Este porcentaje aumenta también en el número de cigotos con patrón normal de fecundación.
3. Los embriones obtenidos son significativamente más alto los de tipo A tanto en general, como en los transferidos a las pacientes.
4. El aumento de la tasa de embarazos y nacidos vivos, en comparación al grupo al que no se le suministró la hormona es significativamente mayor.
5. En el uso de la hormona de crecimiento en mujeres sometidas a ovodonación mejora la calidad del endometrio, incrementando la tasa de implantación.
6. Como consecuencia, aumenta significativamente la tasa de embarazos, de ecografías con latido cardiaco positivo y de nacimientos.
7. El grupo de mujeres, sin problemas en el soporte de la fase lútea en los que se utilizó una única dosis del agonista de la GnRH, presentaron un incremento de los niveles de progesterona, un aumento de la secreción de β -HCG y mayor tasa de implantación, embarazos y nacimientos.
8. En el grupo de mujeres con problemas en los niveles hormonales de progesterona, durante la fase lútea se consiguió un aumento importante de las tasas de implantación, secreción de β -HCG y de progesterona. Y como consecuencia, se incrementan las tasas de embarazos, ecografías con latidos positivos y nacimientos.



BIBLIOGRAFÍA



Abbas A, Maryam E, Farnaz M, Fariba Y. Outcome of assisted reproductive technology in women aged 40 years and older. *Iran J Reprod Med.* 2011; 9(4): 281–284.

Abdalla HI, Burton G, Kirkland A, Johnson MR, Leonard T, Brooks AA, Studd JW. Age, pregnancy and miscarriage: uterine versus ovarian factors. *Hum Reprod,* 1993; 8:1512–1517.

Adashi EY. Ovarian life cycle. 1997. *Hum Reprod.*

Al Inany H, Aboulghar M, Mansour R, Serour G. Meta-analysis of recombinant versus urinary-derived FSH: an update. *Hum Reprod,* 2003; 18:305-13.

Albano C, Smitz J, Camus M, Coelingh Bennink H, Van Steirteghem AC, Devroey P. Pregnancy and childbirth in an in-vitro fertilization cycle after controlled ovarian stimulation in a woman with a history of allergic reaction to human menopausal gonadotropin. *Hum Reprod,* 1996; 11: 1632-1634.

Alikani M, Calderon G, Tomkin G, Garrisi J, Kokot M, Cohen J. Cleavage anomalies in early human embryos and survival after prolonged culture in Vitro. *Hum Reprod,* 2000; 15:2634-2643.

Alikani M. Epithelial cadherin distribution in abnormal human pre-implantation embryos. *Hum Reprod,* 2005; 20: 3369-3375.

Altmäe S, Mendoza-Tesarik R, Mendoza C, Mendoza N, Cucinelli F, Tesarik J. Effect of growth hormone on uterine receptivity in women with repeated implantation failure in an oocyte donation program: a randomized controlled trial. *J Endocr Soc,* 2018; 2(1):96-105.

Andolz P, Bielsa MA, Vila J. Evolution of semen quality in North-eastern Spain: a study in 22,759 infertile men over a 36 year period. *Hum Reprod,* 1999. 14 (3): 731-5.

Angell R. First meiotic division nondisjunction in human oocytes. *Am J Hum Genet,* 1997; 61: 23–32.



Angell RR. Chromosomal anomalies in human oocytes in relation to age. *Hum Reprod*, 1993; 8: 1047–1054.

Bachelot A, Monget P, Imbert-Bolloré P, Coshigano K, Kopchick JJ, Kelly PA, Binart N. Growth hormone is required for ovarian follicular growth. *Endocrinology*, 2002; 143:4104–4112.

Balaban B, Urman B, Sertac C, Alatas C, Aksoy S, Mercan R. Blastocyst quality affects the success of blastocyst-stage embryo transfer. *Fertil Steril*. 2000; 74:282-287.

Balaban B, Urman B, Sertac A, Alatas C, Aksoy S, Mercan R. Oocyte morphology does not affect fertilization rate, embryo quality and implantation rate after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*, 1998; 13:3431-3433.

Balaban B, Urman B. Effect of oocyte morphology on embryo development and implantation. *Reprod Biomed Online* 2006; 12:608-615.

Balaban B, Yakin K, Urman B, Isiklar A, Tesarik J. Pronuclear morphology predicts embryo development and chromosome constitution. *Reprod Biomed Online*, 2004; 8(6):695-700.

Balakier H, Bouman D, Sojecki A, Librach C, Squire JA. Morphological and cytogenetic analysis of human giant oocytes and giant embryos. *Hum Reprod*, 2002; 17: 2394–2401.

Balakier H, Sojecki A, Motamedi G, Bashar S, Mandel R, Librach C. Is the zona pellucida thickness of human embryos influenced by women's age and hormonal levels? *Fertil and Steril*, 2012; 98: 77–83.

Balasz J, Martinez F, Jové I, Cabré L, Coroleu B, Barri PN, Vanrell JA. Inadvertent gonadotrophin-releasing hormone agonist (GnRHa) administration in the luteal phase may improve fecundity in in-vitro fertilization patients, *Hum Reprod*, 1993; vol. 8 (pg. 1148-1151).



Balasch J, Fábregues F. Is luteinizing hormone needed for optimal ovulation induction? *Curr Opin Obstet Gynecol*, 2002; 14(3):265-74.

Balasch J, Peñarrubia J, Fábregues F, Vidal E, Casamitjana R, Manau D, Carmona F, Creus M, Vanrell JA. Ovarian responses to recombinant FSH or HMG in normogonadotropic women following pituitary desensitization by depot GnRH agonista for assisted reproduction. *Reprod Biomed online*, 2003; 7:35-42.

Balasch J. Desarrollo folicular y ovulación. Regulación endocrina. En: Vanrell SA, Calaf S, Balasch J, Viscasillas P. Ediciones científicas y técnicas. Barcelona: Edit. Msson-Salvat, 1992; 25-35.

Balmaceda JP, Bernardini L, Ciuffardi I, Felix C, Ord T, Sueldo CE, Asch RH. Oocyte donation in humans: a model to study the effect of age on embryo implantation. *Hum Reprod*, 1994; 9:2160–2163.

Bancsi LF, Broekmans FJ, Eijkemans MJ, de Jong FH, Habbema JD, Te Velde ER. Predictors of poor response in vitro fertilization: a prospective study comparing basal markers of ovarian reserve. *Fertil Steril*, 2002; 77:328-36.

Bar-Hava I, Mizrachi Y, Karfunkel-Doron D, Omer Y, Sheena L, Carmon N, Ben-David G. Intranasal gonadotropin-releasing hormone agonist (GnRHa) for luteal-phase support following GnRHa triggering, a novel approach to avoid ovarian hyperstimulation syndrome in high responders. *Fertil Steril*, 2016;106(2):330-3.

Battaglia DE, Goodwin P, Klein NA, Soules MR. Influence of maternal age on meiotic spindle assembly in oocytes from naturally cycling women. *Hum Reprod*, 1996; 11:2217–2222.

Beckers NG, Macklon NS, Eijkemans MJ, Ludwig M, Felberbaum RE, Diedrich K, Bustion S, Loumaye E, Fauser BC. Nonsupplemented luteal phase characteristics after the administration of recombinant human chorionic gonadotropin, recombinant luteinizing hormone, or gonadotropin-releasing hormone (GnRH) agonist to induce final oocyte



maturation in in vitro fertilization patients after ovarian stimulation with recombinant follicle-stimulating hormone and GnRH antagonist cotreatment. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003; 88(9):4186-4192.

Biggers and Racowsky. The development of fertilized human ova to the blastocyst stage in KSOMAA medium: is a two-step protocol necessary?. *Reprod Biomed Online*, 2002; 5: 133-140.

Blumenfeld Z, Amit T, Barkey RJ, Lunenfeld B, Brandes JM. Synergistic effect of growth hormone and gonadotropins in achieving conception in “clonidine-negative” patients with unexplained infertility. *Ann N Y Acad Sci*, 1991; 626, 250-265.

Blumenfeld Z, Amit T. The role of growth hormone (GH), GH-receptor and GH-binding protein in reproduction and ovulation. *J Pediatr Endocrinol Metab*, 1996; 9: 145-162.

Blumenfeld Z, Amit T. The role of growth hormone in ovulation induction. *Ann. Med.* 1994, 26, 249-254. Homburg R, Ostergaard H. Clinical applications of growth hormone for ovarian stimulation. *Hum Reprod Update*, 1995; 1: 264-275.

Blumenfeld Z, Dirnfeld M, Gonen Y , Abramovici H. Growth hormone co-treatment for ovulation induction may enhance conception in the co-treatment and succeeding cycles, in clonidine negative but not clonidine positive patients. *Hum Reprod*, 1994; 9:209–213.

Borini A, Tarozzi N, Bizzaro D, Bonu MA, Fava L, Flamigni C, Coticchio G. Sperm DNA fragmentation: paternal effect on early post-implantation embryo development in ART. *Hum Reprod*, 2006; 21: 2876-2881.

Bosdou JK, Kolibianakis EM, Venetis CA, Zepiridis L, Chatzimeletiou K, Makedos A, Triantafyllidis S, Masouridou S, Mitsoli A, Tarlatzis B. Is the time interval between HCG administration and oocyte retrieval associated with oocyte retrieval rate?. *RBMO*, 2015; Vol. 31:5, 625-632.



Broekmans FJ. Testing for Ovarian Reserve in Assisted Reproduction programs: the current point of view. *Facts Views Vis Obgyn*, 2009; 1(2): 79–87.

Carlsen E, Giwercman A, Keiding N, Skakkebaek NE. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *Hum Reprod*, 1999; 14 (3): 731-5.

Chen C, Kattera S. Comparison of pronuclear zygote morphology and early cleavage status of zygotes as additional criteria in the selection of day 3 embryos: a randomized study. *Fertil Steril*, 2006; 85:347-352.

Chou CS, MacCalman CD, Leung PC. Differential effects of gonadotropin-releasing hormone I and II on the urokinase-type plasminogen activator/plasminogen activator inhibitor system in human decidual stromal cells in vitro. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003; 88(8):3806-15.

Ciotti PM, Notarangelo L, Morselli-Labate AM, Felletti V, Porcu E, Venturoli S. First polar body morphology before ICSI is not related to embryo quality or pregnancy rate. *Hum Reprod*, 2004; 19:2334-2339.

Ciray HN, Karagenc L, Ulug U, Bener F, Bahçeci M. Early cleavage morphology affects the quality and implantation potential of day 3 embryos. *Fertil Steril*, 2006; 85:358-365.

Ciray HN, Karagenc L, Ulug U, Bener F, Bahceci M. Use of both early cleavage and day 2 mononucleation to predict embryos with high implantation potential in intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertil Steril*, 2005; 84:1411-1416.

Cleine H. Retrograde ejaculation: can sperm retrieval be simpler and oninvasive? *Fertil Steril*, 2000; 74 (2): 416-417.

Cockbum K and Rossant, J. making the blastocyst: lesson from the mouse. *The Journal of Clinical Investigation*, 2010; 120 (4): 995-1003.



Cohen-Bacrie P, Belloc S, Menezo YJ, Clement P, Hamidi J, Benkhalifa M. Correlation between DNA damage and sperm parameters: a prospective study of 1,633 patients. *Fertil Steril*, 2009; 91(5): 1801-1805.

Cushman RA, De Souza JC, Hedgpeth VS, Britt JH. Effect of long-term treatment with recombinant bovine somatotropin and estradiol on hormone concentrations and ovarian response of superovulated cattle. *Theriogenology*, 2001; 55:1533–1547.

Dailey T, Dale B, Cohen J, Munné S. Association between nondisjunction and maternal age in meiosis-1 in human oocytes. *Am J Genet*, 1996; 59:176–184.

Daya S, Gunby J. Luteal phase support in assisted reproduction cycles. *BMJ*, 1992; 305(6854):609-13.

Daya S. Gonadotropin releasing hormone agonist protocols for pituitary desensitization in in vitro fertilization and gamete intrafallopian transfer cycles. *Cochrane Database Syst Rev* 2000; CD 001299.

De Brucker M, Tournaye H, Haentjens P, Verheyen G, Collins J, Camus M. Assisted reproduction counseling in women aged 40 and above: a cohort study. *J Assist Reprod Genet*, 2013; 30(11): 1431–1438.

De Cherney AH, Basil C, Laufer N. Follicular development: lessons learned from human in vitro fertilization. *Am J Obstet Gynecol*, 1985; 153: 911.

De Placido G, Wilding M, Strina I, Alviggi E, Alviggi C, Mollo A, Varicchio MT, Tolino A, Schiattarella C, Dale B. High outcome predictability after IVF using a combined score for zygote and embryo morphology and growth rate. *Hum Reprod*, 2002; 17: 2402-2409.



De Ziegler D, Pirtea P, Carbonnel M, Poulain M, Cicinelli E, Bulletti C, Kostaras K, Kontopoulos G, Keefe D, Ayoubi JM. Assisted reproduction in endometriosis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2018; (18)30115-5.

Dellenbach P, Nisand I, Moureau L, Feger B, Plumere C, Gelinger P. Transvaginal sonographically controlled follicle puncture for oocyte retrieval. *Fertil and Steril*, 1985; vol. 44, n°5, 656-662

Desai NN1, Goldstein J, Rowland DY, Goldfarb JM. Morphological evaluation of human embryos and derivation of an embryo quality scoring system specific for day 3 embryos: a preliminary study. *Hum Reprod*, 2000; 15(10):2190-6.

Di Zerega GS and Hodgen GD. Folliculogenesis in the primate ovarian cycle. *Endocr Rev*, 1981; 2(1):27-49.

Dickey RP and Holtkamp DE. Development, pharmacology and clinical experience with clomiphene citrate. *Hum Reprod Update*, 1996; 2:483.

Dor J, Seidman DS, Amudai E, Bider D, Levran D, Maschiach S. Adjuvant growth hormone therapy in poor responders to in-vitro fertilization: a prospective randomized placebo-controlled double-blind study. *Hum. Reprod*, 1995; 10: 40-43.

Dunietz GL, Holzman C, McKane P, Li C, Boulet SL, Todem D, Kissin DM, Copeland G, Bernson D, Sappenfield WM, Diamond MP. Assisted reproductive technology and the risk of preterm birth among primíparas. *Fertil Steril*, 2015; 103(4):974-979.

Ebner T, Moser M, Sommergruber C, Yaman C, Pflieger U, Tews G. First polar body morphology and blastocyst formation rate in ICSI patient. *Hum Reprod*, 2002; 17:2415-2418.

Ebner T, Moser M, Yaman C, Feichtinger O, Hartl J, Tews G. Elective transfer of embryos selected on the basis of first polar body morphology is associated with increased rates of implantation and pregnancy. *Fertil Steril*, 1999; 72:599-603.



Ebner T, Shebl O, Moser M, Sommergruber M, Tews G. Developmental fate of ovoid oocytes. *Hum Reprod*, 2008; 23: 62–66.

Ebner T, Yaman C, Moser M, Sommergruber M, Feichtinger O, Tews G. Prognostic value of polar body morphology on fertilization rate and embryo quality in intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*, 2000; 15:427-430.

Ebner, Moser M, Sommergruber M, Gaiswinkler U, Shebl O, Jesacher K, Tews G. Occurrence and developmental consequences of vacuoles throughout preimplantation development. *Fertil Steril*, 2005a; 83:1635-1640.

Ebner, Tews G, Tews G, Sommergruber M, Moser M. Cytoplasmic pitting has a negative influence on implantation outcome. *J Assist Reprod Genet*, 2005b; 22: 39-244.

Edwards RG, Fishel SB, Cohen J, Fehilly CB, Purdy JM, Slater JM, Steptoe PC, Webster JM. Factors influencing the success of in vitro fertilization for alleviating human infertility. *J In Vitro Fertil Embryo Transfer*, 1984; 1:3–23.

Edwards RG and Steptoe PC. Current status of in-vitro fertilisation and implantation of human embryos. *Lancet II*, 1983; (8362); 1265–1269.

Elefant E, Biour B, Blumberg-Tick J, Roux C, Thomas F. Administration of a gonadotropin-releasing hormone agonist during pregnancy: follow-up of 28 pregnancies exposed to triptoreline. *Fertil Steril*, 1993; vol. 63 (pg. 1111-1113).

Endo T, Honnma H, Hayashi T, Chida M, Yamazaki K, Kitajima Y, Azumaguchi A, Kamiya H, Kudo R. Continuation of GnRH agonist administration for 1 week, after hCG injection, prevents ovarian hyperstimulation syndrome following elective cryopreservation of all pronucleate embryos. *Hum Reprod*, 2002; vol. 17 (pg. 2548-2551).



Engel T, Jewelewicz R, Dyrenfurth I, Speroff L, Vande Wiele RL. Ovarian hyperstimulation syndrome: report of a case with notes on pathogenesis and treatment. *J Obstet Gynecol*, 1972; 112:1052.

Esfandiari N, Burjaq H, Gotlieb L, Casper RF. Brown oocytes: implications for assisted reproductive technology. *Fertil and Steril*, 2006; 86: 1522–1525.

European and Australian Multicenter Study. Cotreatment with growth hormone and gonadotropin for ovulation induction in hypogonadotropic patients: a prospective, randomized, placebo-controlled, dose-response study. *Fertil Steril*, 1995; 64:917–923.

Evenson DP, Jost LK, Marshall D, Zinaman MJ, Clegg E, Purvis K, de Angelis P, Claussen OP. Utility of sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Human Reprod*, 1999; 14:1039-1049.

Fancsovits P, Murber A, Gilan ZT, Rigo J Jr, Urbancsek J. Human oocytes containing large cytoplasmic vacuoles can result in pregnancy and viable offspring. *Reprod biomed online*, 2011; 23: 513–516.

Farhi J, Nahum H, Weissman A, Zahalka N, Glezerman M, Levran D. Coarse granulation in the perivitelline space and IVF-ICSI outcome. *J Assist Reprod and Genet*, 2002; 19: 545–549.

Fatemi HM, Popovic-Todorovic B, Papanikolaou E, Donoso P, Devroey P. An update of luteal phase support in stimulated IVF cycles. *Hum Reprod Update*, 2007; 13 (6):581-90.

Fauser B and Devroey P. Why is the clinical acceptance of gonadotropin-releasing hormone antagonist cotreatment during ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization so slow? *Fertil Steril*, 2005; 83:1607-11.

Fauser BC, Donderwinkel P, Schoot DC. The step-down principle in gonadotrophin treatment and the role of GnRH analogues. *Baillieres Clin Obstet Gynecol*, 1993; 7:309-30.



Fauser BC. Step down FSH regimens in PCOS. En: Filicori M, Flagmini C (eds) *Ovulation Induction: Basic Science and Clinical Advances*. Excerpta Medica International Congress Series, 1064. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 1994; pp: 153-62.

Fauser B and Devroey P. Reproductive biology and IVF: ovarian stimulation and luteal phase consequences. *Trends Endocrinol Metab*, 2003; 14(5):236-242.

Feyenisen, Méndez D, Taieb J, Hesters L, Frydman R, Fanchin R. Anti-Mullerian Hormone clinical Insights into a promising biomarker of ovarian follicular status. *Reproductive Biomedicine on Line*, 2006; 12 (6) 695-703.

Filicori M, Butler, JP, Crowley WF Jr. Neuroendocrine regulation of the corpus luteum in the human. Evidence for pulsatile progesterone secretion. *J Clin Invest*, 1984; 73(6):1638-47.

Filicori M, Cognigni G, Ciampaglia W. Effect of LH on oocyte yield and developmental competence. *Hum Reprod*, 2003; 18 (6): 1357-8.

Fish JD, Rodríguez H, Ross R, Overby G, Sher G. The graduate embryo score predicts blastocyst formation and pregnancy rate from cleavage-stage embryos. *Hum Reprod*, 2001; 16: 1970-5.

Flamigni C, Borini A, Violini F, Bianchi L, Serrao L. Oocyte donation: comparison between recipients from different age groups. *Hum Reprod*, 1993; 8:2088–2092.

Fleming R, Rehka P, Deshpande N, Jamieson ME, Yates RW, Lyall H. Suppression of LH during ovarian stimulation: effects differ in cycles stimulated with purified urinary FSH and recombinant FSH. *Hum Reprod*, 2000; 15:1440-5.

Folch J, Ramón JP, Cocero MJ, Alabart JL, Beckers JF. Exogenous growth hormone improves the number of transferable embryos in superovulated ewes. *Theriogenology*, 2001; 55:1777–1785.



Fritz MA, McLachlan RI, Cohen NL, Dahl KD, Bremner WJ, Soules MR. Onset and characteristics of the midcycle surge in bioactive and immunoactive luteinizing hormone secretion influence of physiological variation in periovulatory ovarian steroid hormone secretion. *J Clin Endocrinol Metab*, 1992; 75(2):489-93.

Fritz MA. The modern infertility evaluation. *Clin Obstet Gynecol*, 2012; 55(3):692-705.

Gabrielsen A, Lindenberg S, Petersen K. The impact of the zona pellucida thickness variation of human embryos on pregnancy outcome in relation to suboptimal embryo development. A prospective randomized controlled study. *Hum Reprod*, 2001; 16:2166-2170.

Gadner RL. Cell allocation and lineage in the early mouse embryo. *Ciba Found Symp*, 1989; 144:172-181; discussion 181-189, 208-211.

Garcia J, Jones GS, Acosta AA, Wright GL Jr. Corpus luteum function after follicle aspiration for oocyte retrieval. *Fertil. Steril*, 1981; 36:565-72.

Gartner B, Moreno C, Marinaro A, Remohi J, Simon C, Pellicer A. Accidental exposure to daily long-acting gonadotrophin-releasing hormone analogue administration and pregnancy in an in-vitro fertilization cycle. *Hum Reprod*, 1997; vol. 12 (pg. 2557-2559).

Gindoff PR and Jewelewicz R. Reproductive potential in older women. *Fertil Steril*, 1986; 46:989-1001.

Ginsburg K.A. Luteal phase defect. Etiology, diagnosis and management. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 1992; 21:85-104.

Giorgetti C, Terriou P, Auquier P, Hans E, Spach JL, Salzmann J, Roulier R. Embryo score to predict implantation after in-vitro fertilization: based on 957 single embryo transfers. *Hum Reprod*, 1995; 10:2427-31.



Gleicher N and Barad DH. Assessing in-vitro fertilisation at age 40 years. *Lancet*, 2019; 393(10177):1181-1183.

Golan A, Ron-El R, Herman A, Weinraub Z, Soffer Y, Caspi E. Fetal outcome following inadvertent administration of long-acting D-Trp6 LH-RH microcapsules during pregnancy: a case report. *Hum Reprod*, 1990; vol. 5 (pg. 123-124).

Gosden RG. Maternal age: a major factor affecting the prospects and outcomes of pregnancy. *Ann NY Acad Sci*, 1984; 442:45–57.

Gougeon A. Dynamics of human follicle growth. A morphologic perspective. In book: *The ovary* Publisher: Raven Press, New York Editors: Adashi EY, Leung PCK, 1993; pp: 21-39.

Gougeon A. Regulation of ovarian follicular development in primates: fact and hypotheses. *Endocr rev*, 1996; 17(2):121-55.

Goyanes VJ, Ron-Corzo A, Costas E, Maneiro E. Morphometric categorization of the human oocyte and early conceptus. *Hum Reprod*, 1990; 5:613-618.

Greenblatt RB, Barfield WE, Jungck EC, Ray AW. Induction of ovulation with MRL/41, preliminary report. *JAMA*, 1961; 178:255.

Guillemin R, Amoss M, Blackwell R, Burgus R, Grant G, Ling N, Monahan M, Rivier J, Vale W. Polypeptides antagonists of the hypothalamic luteinizing hormone releasing factor. *Gynecol Invest*, 1971; 2:2-12.

Gunin AG. Influence of growth hormone on the uterine response to oestradiol in rats. *J Reprod Fertil*, 1997; 110(2):299–306.

Hall JE, Schoenfeld DA, Martin KA, Crowley WF Jr. Hypothalamic gonadotropin-releasing hormone secretion and follicle-stimulating hormone dynamics during the luteal-follicular transition. *J Clin Metab*, 2000; 74: 600-7.



Haning Jr RV, Boehnlein L, Carlson I, Kuzma DL, Zweibel WJ. Diagnosis-specific serum 17β estradiol upper limits for treatment with menotropins using a ^{125}I direct E2 assay. *Fertil Steril*, 1984; 42:882.

Haning Jr RV, Levin RM, Behrman HR, Kase NG, Speroff L. Plasma estradiol window and urinary estriol glucuronide determination for monitoring menotrophin induction of ovulation. *Obstet Gynecol*, 1979; 54:442.

Hansen M, Greenop KR, Bourke J, Baynam G, Hart RJ, Leonard H. Intellectual disability in children conceived using assisted reproductive technology. *Pediatrics*, 2018; 142(6).

Hardarson T, Hanson C, Sjögren A, Lundin K. Human embryos with unevenly sized blastomeres have lower pregnancy and implantation rates: indications for aneuploidy and multinucleation. *Hum Reprod*, 2001; 16:313-318.

Harper K, Proctor M, Hughes E. Growth hormone for in vitro fertilization. *Cochrane Database Syst Rev*, 2003; 3:1-33.

Har-Toov J, Brenner SH, Jaffa A, Yavetz H, Peyser MR, Lessing JB. Pregnancy during long-term gonadotropin-releasing hormone agonist therapy associated with clinical pseudomenopause. *Fertil Steril* , 1993; vol. 59 (pg. 446-447).

Hartshorne G, Montgomery S, Klentzeris L. A case of failed oocyte maturation in vivo an in vitro. *Fertil Steril*, 1999; 71:567-570.

Hasler JF, Bilby CR, Collier RJ, Denham SC, Lucy MC. Effect of recombinant bovine somatotropin on superovulatory response and recipient pregnancy rates in a commercial embryo transfer program. *Theriogenology*, 2003; 59:1919–1928.



Hassan HA, Azab H, Rahman AA, Nafee TM. Effects of growth hormone on in vitro maturation of germinal vesicle of human oocytes retrieved from small antral follicles. *J Assist Reprod Genet*, 2003; 18:417–420.

Hassan-Ali H, Hisham-Saleh A, El-Gezeiry D, Baghdady I, Ismaeil I, Mandelbaum J. Perivitelline space granularity: a sign of human menopausal gonadotropin overdose in intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*, 1998; 13:3425-3430.

Hassold T and Chiu D. Maternal age-specific rates of numerical chromosome abnormalities with special reference to trisomy. *Hum Genet*, 1985; 70:11–17.

Hassold T, Warburton D, Kline J, Stein Z. The relationship of maternal age and trisomy among trisomic spontaneous abortions. *Am J Hum Genet*, 1984; 36:1349–1356.

Hendricks D, Mol BW, Bancsi LF, Te Velde ER, Broekmans FJ. Antral follicle count in the prediction of poor ovarian response and pregnancy after in vitro fertilization: a meta-analysis and comparison with basal follicle-stimulating hormone level. *Fertil Steril*, 2005; 83:291-301.

Herman A, Ron-El R, Golan A, Nachum H, Soffer Y, Caspi E. Impaired corpus luteum function and other undesired results of pregnancies associated with inadvertent administration of a long-acting agonist of gonadotrophin-releasing hormone. *Hum Reprod*, 1992; vol. 7 (pg. 465-468).

Hillier SG. Ovarian stimulation with recombinant gonadotrophins: LH as an adjunct to FSH. En: Jacobs HS (eds). *The New Frontier in Ovulation Induction*. Parthenon, Carnforth, UK, 1993; pp:39-47.

Hnida C, Engenheiro E, Ziebe S. Computer-controlled, multilevel, morphometric analysis of blastomere size as biomarker of fragmentation and multinuclearity in human embryos. *Hum Reprod*, 2004; 19:288-293.



Homburg R, Eshel A, Abdalla HI, Jacobs HS. Growth hormone facilitates ovulation induction by gonadotrophins. *Clin Endocrinol (Oxford)*, 1988, 29, 113-117.

Homburg R, Levy T, Ben Rafae Z. Adjuvant growth hormone for induction of ovulation with gonadotrophin-releasing hormone agonist and gonadotrophins in polycystic ovary syndrome: a randomized, double-blind, placebo controlled trial. *Hum Reprod*, 1995; 10:2550–2553.

Hourvitz, A. Machtinger R, Maman E, Baum M, Dor J, Levron J. Assisted reproduction in women over 40 years of age: how old is too old?. *Reprod Biomed Online*, 2009; 19 (4): 599-603.

Hughes SM, Huang ZH, Matson PL, Buck P, Lieberman BA, Morris ID. Clinical and endocrinological changes in women following ovulation induction using buserelin acetate/human menopausal gonadotrophin augmented with biosynthetic human growth hormone. *Hum Reprod*, 1992; 7:770.

Hughes SM, Huang ZH, Morris ID, Matson PL, Buck P, Lieberman BA. A double-blind cross-over controlled study to evaluate the effect of human biosynthetic growth hormone on ovarian stimulation in previous poor responders to in-vitro fertilization. *Hum Reprod*, 1994; 9:13–18.

Hull KL and Harvey S. Growth hormone and reproduction: a review of endocrine and autocrine/paracrine interactions. *Int J Endocrinol*, 2014;2014:234014.

Hull MGR, Fleming CF, Hughes AO, McDermott A. The age-related decline in female fecundity: a quantitative controlled study of implanting capacity and survival of individual embryos after in vitro fertilization. *Fertil Steril*, 1996; 65:783–790.

Ibrahim ZHZ, Matson PL, Buck P, Lieberman BA. The use of biosynthetic growth hormone to augment ovulation induction with buserelin acetate/human menopausal gonadotrophin in women with a poor ovarian response. *Fertil Steril*, 1991; 55:202.



Isherwood PJ, Ibrahim ZA, Matson PL, Morroll DR, Burslem RW, Lieberman BA. Endocrine changes in women conceiving during treatment with a LHRH agonist. *Hum Reprod*, 1990; vol. 5 (pg. 409-412).

Iwashita M, Kudo Y, Shinozaki Y, Takeda Y. Gonadotropin-releasing hormone increases serum human chorionic gonadotropin in pregnant women. *Endocr J*, 1993; vol. 40 (pg. 539-544).

Jackson AE, Curtis P, Amso N, Shaw RW. Exposure to LHRH agonist in early pregnancy following the commencement of mid-luteal buserelin for IVF stimulation. *Hum Reprod*, 1992; vol. 7 (pg. 465-468).

Jackson KV, Ginsburg ES, Hornstein MD, Rein MS, Clarke RN. Multinucleation in normally fertilized embryos is associated with an accelerated ovulation induction response and lower implantation and pregnancy rates in in vitro fertilization-embryo transfer cycles. *Fertil Steril*, 1998; 70:60-66.

Janny L and Ménéz YJR. Maternal age effect on early human embryonic development and blastocyst formation. *Mol Reprod Dev*, 1996; 45:31–37.

Johansson M, Hardarson T, Lundin K. There is a cutoff limit in diameter between a blastomere and small anucleate fragment. *J Assisted Reprod Genet*, 2003; 20: 309-13.

Jordan J, Craig K, Clifton DK, Soules MR. Luteal phase defect: the sensitivity and specificity of diagnostic methods in common clinical use. *Fertil Steril*, 1994;62(1):54-62.

Kahraman S, Yakin K, Dönmez E, Samli H, Bahçe M, Cengiz G, Sertyel S, Samli M, Imirzalioglu N. Relationship between granular cytoplasm of oocytes and pregnancy outcome following intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*, 2000; 15:2390-2393.

Khorram O, Shapiro S, Jones J. Transfer of nonassisted hatched and hatching human blastocysts alter in Vitro fertilization. *Fertil Steril*. 2000; 74:163-165.



Kim CH, Chae HD, Chang YS. Pyridostigmine cotreatment for controlled ovarian hyperstimulation in low responders undergoing in vitro fertilization-embryo transfer. *Fertil Steril*, 1999; 71:652–657.

King CM and Kovacs GT. Oocyte donation: review of results. *Reprod Fertil Dev*, 1992; 4:719–724.

Kitajima Y, Endo T, Manase K, Nishikawa A, Shibuya M, Kudo R. Gonadotropin-releasing hormone agonist administration reduced vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF receptors, and vascular permeability of the ovaries of hyperstimulated rats. *Fertil Steril*, 2004; vol. 81 Suppl. 1(pg. 842-849).

Klinkert ER, Broekmans FJ, Looman CW, Te Velde ER. A poor response in the first in vitro fertilization cycles is not necessarily related to a poor prognosis in subsequent cycles. *Fertil Steril*, 2004; 81:1247-53.

Kobayashi M, Nakano R, Ooshima A. Immunohistochemical localization of pituitary gonadotrophins and gonadal steroids confirms the “two-cell, two-gonadotrophin” hipótesis of steroidogenesis in the human ovary. *J Endocrinol*, 1990; 126(3):483-8.

Kolibianakis EM, Bourgain C, Platteau P, Albano C, Van Steirteghem AC, Devroey P. Abnormal endometrial development occurs during the luteal phase of nonsupplemented donor cycles treated with recombinant follicle-stimulating hormone and gonadotropin-releasing hormone antagonists. *Fertil Steril*, 2003; vol. 80 (pg. 464-466).

Kollmann M, Martins WP, Lima ML, Craciunas L, Nastri CO, Richardson A, Raine-Fenning N. Strategies for improving outcome of assisted reproduction in women with polycystic ovary syndrome: systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2016; 48(6):709-718.

Kornafel KL and Sauer M. Increased rates of aneuploidy in older women: increased rates of aneuploidy do not occur in gestations of older embryo recipients. *Hum Reprod*, 1994; 9:1981–1982.



Kotarba D, Kotarba J, Hughes E. Growth hormone for in vitro fertilization. *Cochrane Database Syst Rev* 2, 2000. CD000099.

Kovacic B, Vlajsavljevic V, Reljic M, Cizek-Sajko M. Developmental capacity of different morphological types of day 5 human morulae and blastocysts. *Reprod Biomed Online*, 2004; 8: 687-694.

Krasnow JS, Berga SL, Guzick DS, Zeleznik AJ, Yeo KT. Vascular permeability factor and vascular endothelial growth factor in ovarian hyperstimulation syndrome: a preliminary report. *Fertil Steril*, 1996; vol. 65 (pg. 552-555).

Lanzone A, Fortini A, Fulghesu AM, Soranna L, Caruso A, Mancuso S. Growth hormone enhances estradiol production follicle-stimulating hormone-induced in the early stage of the follicular maturation. *Fertil Steril*, 1996; 66:948–953.

Lavarge H, De Sutter P, Van der Elst J, Dhont M. A prospective, randomized study comparing day 2 and day 3 embryo transfer in human IVF. *Hum Reprod*, 2001; 16: 476-80.

Lemay A, Faure N, Labrie F. Sensitivity of pituitary and corpus luteum responses to single intranasal administration of buserelin in normal women. *Fertil Steril*, 1982; vol. 37 (pg. 193-200).

Lemay A, Faure N, Labrie F, Fazekas AT. Gonadotrophin and corpus luteum responses to two successive intranasal doses of a luteinising hormone-releasing hormone agonist at different days after the mid-cycle luteinising hormone surge. *Fertil Steril*, 1983; vol. 39 (pg. 661-687).

Lenton EA, Landgren BM, Sexton L. Normal variation in the length of the luteal phase of the menstrual cycle: identification of the short luteal phase. *Br J Obstet Gynaecol*, 1984; 91(7):685-9.



Leth-Moller K, Hammer Jagd S, Humaidan P. The luteal phase after GnRHa trigger – understanding an enigma. *Int J Fertil Steril*, 2014; 8(3):227-34.

Levrán D, Ben-Shlomo I, Dor J, Ben-Rafael Z, Nebel L, Mashiach S. Aging of endometrium and oocytes: observations on conception and abortion rates in an egg donation model. *Fertil Steril*, 1991; 56:1091–1094.

Levron J, Lewit N, Erlik Y, Itskovitz-Eldor J. No beneficial effects of human growth hormone therapy in normal ovulatory patients with a poor ovarian response to gonadotropins. *Gynecol Obstet Invest*, 1993; 35:65–68.

Levy T, Limor R, Villa Y, Eshel A, Eckstein N, Vagman I, Lidor A, Ayalon D. Another look at co-treatment with growth hormone and human menopausal gonadotrophins in poor ovarian responders. *Hum Reprod*, 1993; 8:834.

Lin L, Roberts VJ, Yen S. Expression of human gonadotropin-releasing hormone receptor gene in the placenta and its functional relationship to human chorionic gonadotropin secretion. *J Clin Endocrinol Metab*, 1995; vol. 80 (pg. 580-585).

Lundin K, Bergh C, Hardarson T. Early embryo cleavage is a strong indicator of embryo quality in human IVF. *Hum Reprod*, 2001; 16:2652-2657.

Macklon NS and Fauser BC. Impact of ovarian hyperstimulation on the luteal phase. *J Reprod Fertil Suppl*, 2000; vol. 55 (pg. 101-108)

Maggi R, Cariboni AM, Marelli MM, Moretti RM, André V, Marzagalli M, Limonta P. GnRH and GnRH receptors in the pathophysiology of the human female reproductive system. *Hum Reprod Update*, 2016; 22(3):358–81.

Mason HD, Martikainen H, Beard RW, Anyaoku V, Franks S. Direct gonadotropin effect of growth hormone on estradiol production by human granulosa cells. *J Endocrinol*, 1990; 126:R1–R4.



McClure N, Healy DL, Rogers PA, Sullivan J, Beaton L, Haning RVJr, Connolly DT, Robertson DM. Vascular endothelial growth factor as capillary permeability agent in ovarian hyperstimulation syndrome. *Lancet*, 1994; vol. 344 (pg. 235-236).

McGee EA and Hsueh AJ. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr Rev*, 2000; 21(2):200-14.

Mendoza C and Testart J. Factors associated with fractured zonae pellucidae in an in-vitro fertilization programme. *Hum Reprod*, 1986; Vol. 1, Issue 3, Pages 175–180.

Mendoza C, Cremades N, Ruiz-Requena E, Martinez F, Ortega E, Bernabeu S, Tesarik J. Relationship between fertilization results after intracytoplasmic sperm injection, and intrafollicular steroid, pituitary hormone and cytokine concentrations. *Hum Reprod*, 1999; 14:628–635.

Mendoza C, Ruiz-Requena E, Ortega E, Cremades N, Martinez F, Bernabeu R, Greco E, Tesarik J. Follicular fluid markers of oocyte developmental potential. *Hum Reprod*, 2002; 17:1017–1022.

Mendoza-Tesarik R, Mendoza N, Conde López C, Tesarik J. GnRH agonist treatment of luteal phase deficiency in HCG-triggered IVF cycles: a matched case-control study. *Reprod Biomed Online*. 2019.

Mendoza-Tesarik R, Tesarik J. Usefulness of individualized FSH, LH and GH dosing in ovarian stimulation of women with low ovarian reserve. *Hum Reprod*, 2018; 1;33(5):981-982.

Menezo Y, Clément P, Dale B. DNA methylation pattern in the early human embryo and the epigenetic/imprinting problems: A plea for a more careful approach to human assisted reproductive technology (ART). *Int J Mol Sci*, 2019; 20:1342.



Meriano J, Clark C, Cadesky K, Laskin CA. Binucleated and micronucleated blastomeres in embryos derived from human assisted reproduction cycles. *Reprod Biomed Online*, 2004; 9(5):511-20.

Meriano JS, Alexis J, Visram-Zaver S, Cruz M, Casper RF. Tracking of oocyte dysmorphisms for ICSI patients may prove relevant to the outcome in subsequent patient cycles. *Hum Reprod*, 2001; 16:2118-2123.

Merviel P, Antoine JM, Mathieu E, Millot F, Mandelbaum J, Uzan S. Luteinizing hormone concentrations alter gonadotropin-releasing hormone antagonist administration do not influence pregnancy rates in in Vitro fertilization- embryo transfer. *Fertil Steril*, 2004; 82:119-25.

Moreira F, Badinga L, Burnley C, Thatcher WW. Bovine somatotropin increases embryonic development in superovulated cows and improves post-transfer pregnancy rates when given to lactating recipient cows. *Theriogenology*, 2002; 57:1371–1378.

Morris RS, Paulson RJ, Sauer MV, Lobo RA. Predictive value of serum oestradiol concentrations and oocyte number in severe ovarian hyperstimulation syndrome. *Hum Reprod*, 1995; 10:811.

Munné S and oeh

Cohen J. Chromosome abnormalities in human embryos. *Hum Reprod*, 1998; update 4:842-55.

Murdoch WJ. Immunolocalization of a GnRH receptor site in murine endometrium that mediates apoptosis. *Cell Tissue Res*, 1995; vol. 282 (pg. 527-529).

Navot D, Drews MR, Bergh PA, Guzman I, Karstaedt A, Scott RT Jr, Garrisi GJ, Hofmann GE. Age-related decline in female fertility is not due to diminished capacity of the uterus to sustain embryo implantation. *Fertil Steril*, 1994; 61:97–101.



Neuber E, Rinaudo P, Trimarchi JR, Sakkas D. Secuential assessment of individually cultured human embryos as an indicator of subsequent good quality blastocisto development. *Hum Reprod*, 2003; 18:1307-1312.

Neulen J, Yan Z, Raczek S, Weindel K, Keck C, Weich HA, Marme D, Breckwoldt M. Human chorionic gonadotropin-dependent expression of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor in human granulosa cells: importance in ovarian hyperstimulation syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*, 1995; vol. 80 (pg. 1967-1971).

Oehninger S and Hodgen GD. Induction of ovulation for assisted reproduction programmes. *Baillieres Clin Obstet Gynecol*, 1990; 4:541-73.

Olivennes F, Alvarez S, Bouchard P, Fanchin R, Salat-Baroux J, Frydman R. The use of a GnRH antagonist (Cetrorelix) in a silgle dose protocol in IVF-embryo transfer: a dose finding study of 3 versus 2mg. *Hum Reprod*, 1998; 13:2411-14.

Otsuki J, Okada A, Morimoto K, Nagai Y, Kubo H. The relationship between pregnancy outcome and smooth endoplasmic reticulum clusters in MII human oocytes. *Hum Reprod*, 2004; 19:1591-1597.

Owen EJ, Shoham Z, Mason BA, Ostergaard H, Jacobs HS. Cotreatment with growth hormone, after pituitary suppression, for ovarian stimulation in in vitro fertilization: a randomized, double blind, placebo-control trial. *Fertil Steril*, 1991; 56:1104.

Owen EJ, West C, Mason BA, Jacobs HS. Co-treatment with growth hormone of sub-optimal responders in IVF-ET. *Hum Reprod*, 1991; 6:524–528.

Padma Rekha Jirge. Poor ovarian reserve. *J Hum Reprod Sci*, 2016; 9(2): 63–69.

Paulson RJ, Sauer MV, Lobo RA. In vitro fertilization in unstimulated cycles: a new application. *Fertil Steril*, 51; 1059, 1989.



Payne D, Flaherty SP, Barry MF, Matthews CD. Preliminary observations on polar body extrusion and pronuclear formation in human oocytes using time-lapse video cinematography. *Hum Reprod*, 1997; 12:532-541.

Pelinck MJ, De Vos M, Dekens M, Van der Elst J, De Sutter P, Dhont M. Embryos cultured in vitro with multinucleated blastomeres have poor implantation potential in human in-vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*, 1998; 13:960-963.

Peñarrubia J, Fábregues F, Creus M, Manau D, Casamitjana R, Guimerá M, Carmona F, Vanrell JA, Balasch J. LH serum levels during ovarian stimulation as predictors of ovarian response and assisted reproduction outcome in down-regulated women stimulated with recombinant FSH. *Hum Reprod*, 2003; 18:2689-97.

Piette C, Mouzon J, Bachelot A, Spira A. In-vitro fertilization: influence of women's age on pregnancy rate. *Hum Reprod*, 1990; 5:56-60.

Pirard C, Donnez J, Loumaye E. GnRH agonist as novel luteal support: results of a randomized, parallel group, feasibility study using intranasal administration of buserelin. *Hum Reprod*, 2005; vol. 20 (pg. 1798-1804).

Pirard C, Loumaye E, Laurent P, Wyns C. Contribution to more patient-friendly ART treatment: Efficacy of continuous low-dose GnRH agonist as the only luteal support – results of a prospective, randomized, comparative study. *Int J Endocrinol*, 2015; 2015:727569.

Powers M. Performance-Enhancing Drugs. En Deidre Leaver-Dunn; Joel Houglum; Harrelson Gary L. *Principles of Pharmacology for Athletic Trainers*. Slack Incorporated, 2005 Pp. 331-332.

Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine. The relevance of luteal phase deficiency: a committee opinion. *Fertil Steril*, 2012; 98(5):1112-7.



Pritts EA and Atwood AK. Luteal phase support in infertility treatment: a meta-analysis of the randomized trials. *Hum Reprod*, 2002; vol. 17 (pg. 2287-2299).

Rabinovici J and Jaffe RB. Development and regulation of growth and differentiated function in human and subhuman primate fetal gonads. *Endocr Rev*, 1990; 11(4):532-57.

Racowsky C, Combelles CM, Nureddin A, Pan Y, Finn A, Miles L, Gale S, O'Leary T, Jackson KV. Day 3 and day 5 morphological predictors of embryo viability. *Reprod Biomed Online*, 2003; 6:232-331.

Rahu K, Allvee K, Karro H, Rahu M. Singleton pregnancies after in vitro fertilization in Estonia: a register-based study of complications and adverse outcomes in relation to the maternal socio-demographic background. *BMC Pregnancy and Childbirth*, 2019; 19:51.

Reshef E, Lei ZM, Rao CV, Pridham DD, Chegini N, Luborsky JL. The presence of gonadotropin receptors in nonpregnant human uterus, human placenta, fetal membranes, and decidua. *J Clin Endocrinol Metab*, 1990; 70(2):421-30.

Richards JS. Perspective: the ovarian follicle--a perspective in 2001. *Endocrinology*, 2001; 142(6):2184-93.

Rienzi L, Ubaldi F, Iacobelli M, Romano S, Minasi MG, Ferrero S, Sapienza S, Baroni E, Greco E. Significance of morphological attributes of the early embryo. *Reprod Biomed Online*, 2005; 10:669-681.

Rienzi, Ubaldi F, Minasi MG, Iacobelli M, Martinez F, Tesarik J, Greco E. Blastomere cytoplasmic granularity is unrelated to developmental potential of day 3 human embryos. *J Assist Reprod Genet*, 2003; 20: 314-317.

Ritcher KS, Harris DC, Daneshmand ST, Shapiro BS. Quantitative grading of a human blastocyst: optimal inner cell mass size and shape. *Fertil Steril*, 2001; 76:1157-1167.



Ritchie WGM. Ultrasound in the evaluation of normal and induced ovulation. *Fertil Steril*, 1985; 43:167.

Rizk B and Smith J. Ovarian hyperstimulation syndrome after superovulation using GnRH agonist for IVF and related procedures. *Hum Reprod*, 1992; 7:320.

Ron-El R, Golan A, Herman A, Raziel A, Soffer Y, Caspi E. Midluteal gonadotropin-releasing hormone analog administration in early pregnancy. *Fertil Steril*, 1990; vol. 53 (pg. 572-574).

Safran A, Reubinoff BE, Porat-Katz A, Schenker JG, Lewin A. Assisted reproduction for the treatment of azoospermia. *Hum Reprod*, 1998;13 Suppl 4:47-60.

Salumets A, Hydén-Granskog C, Mäkinen S, Suikkari AM, Tiitinen A, Tuuri T. Early cleavage predicts the viability of human embryos in elective single embryo transfer procedures. *Hum Reprod*, 2003; 18:821-825.

Salumets A, Hydén-Granskog C, Suikkari AM, Tiitinen A, Tuuri T. The predictive value of pronuclear morphology of zygotes in the assessment of human embryo quality. *Hum Reprod*, 2001; 16:2177-2181.

Sauer MV, Paulson RJ, Lobo RA. Pregnancy after age 50: application of oocyte donation to women after natural menopause. *Lancet*, 1991; 341:321–323.

Sauerbrun-Cutler MT, Vega M, Breborowicz A, Gonzales E, Stein D, Lederman M, Keltz M. Oocyte zona pellucida dysmorphology is associated with diminished in-vitro fertilization success. *J Ovarian Res*, 2015; 8: 5.

Schally AV, Baba Y, Nair RM, Nair RMG, Bennett CD. The amino acid sequence of a peptide with growth hormone-releasing activity isolated from porcine hypothalamus. *J Biol Chem*, 1971; 246:6647-50.



Schenker JG. Prevention and treatment of ovarian hyperstimulation. *Hum Reprod*, 1993; 8:653.

Schramm RD, Paprocki AM, Bavister BD. Features associated with reproductive ageing in female rhesus monkeys. *Hum Reprod*, 2002; 17:1597–1603.

Scott L. Predicting Embryo Development. *Manual on Assisted Reproduction*. Springer, 2000; p. 321-338.

Semião-Francisco L, Braga DP, Figueira Rde C, Madaschi C, Pasqualotto FF, Iaconelli A Jr, Borges E Jr. Assisted reproductive technology outcomes in azoospermic men: 10 years of experience with surgical sperm retrieval. *Aging Male*, 2010;13(1):44-50.

Serhal PF, Ranieri DM, Kinis A, Marchant MD, Khadum IM. Oocyte morphology predicts outcome of intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*, 1997; 12:1267-1270.

Shaked GM, Shaked Y, Kariv-Inbal Z, Halimi M, Avraham I, Gabizon R. A protease-resistant prion protein isoform is present in urine of animals and humans affected with prion diseases. *J Biol Chem*, 2001; 276:31479-82.

Shander D, Anderson LD, Barraclough CA, Channing CP. Interactions of porcine follicular fluid with ovarian steroids and luteinizing hormone-releasing hormone on the secretion of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone by cultured pituitary cells. *Endocrinology*, 1980; 106: 237-42.

Shapiro BS, Richter KS, Harris DC, Daneshmand ST. A comparison of day 5 and day 6 blastocyst transfer. *Fertile Steril*, 2001; 75:1126-1130.

Shoham Z, Homburg R, Owen EJ, Conway GS, Ostergaard H, Jacobs HS. The role of treatment with growth hormone in infertile patients. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol*, 1992; 6, 267-281.



Shoukir Y, Campana A, Farley T, Sakkas D. Early cleavage of in Vitro fertilized human embryos to the 2 cell stage: a novel indicator of embryo quality and viability. Hum Reprod, 1997; 12:1531-1536.

Shoukir Y, Chardonnens D, Campana A, Bischof P, Sakkas D. The rate of development and time of transfer play different roles in influencing the viability of human blastocysts. Hum Reprod, 1998; 13:676-681.

Siler-Khodr TM, Smikle CB, Sorem KA, Grayson MA, Spencer DK, Yoder BK, Khodr GS. Effect of excessive GnRH-binding substance on circulating maternal hCG in human pregnancy. Early Pregnancy, 1997; vol. 3 (pg. 10-14).

Skarin G, Nillius SJ, Wide L. Failure to induce early abortion by huge doses of a superactive LHRH agonist in women. Contraception, 1982; vol. 26 (pg. 457-463).

Smitz J, Camus M, Devroey P, Bollen N, Tournaye H, Van Steirteghem AC. The influence of inadvertent intranasal buserelin administration in early pregnancy. Hum Reprod, 1991; vol. 6 (pg. 290-293).

Soede NM, Helmond FA, Kemp B. Periovarian profiles of oestradiol, LH and progesterone in relation to oestrus and embryo mortality in multiparous sows using transrectal ultrasonography to detect ovulation. J Reprod Fertil, 1994; 101(3): 633-41.

Spiliotis BE. Growth hormone insufficiency and its impact on ovarian function. Ann NY Acad Sci, 2003; 997:77-84.

Staessen C, Camus M, Bollen N, Devroey P, Van Steirteghem AC. The relationship between embryo quality and the occurrence of multiple pregnancies. Fertil.Steril, 1992; 57: 626-30.

Steer CV, Mills CL, Tan SL, Campbell S, Edwards RG. The cumulative embryo score: a predictive embryo scoring technique to select the optimal number of embryos to transfer in a in vitro fertilization and embryo transfer programme. Hum Reprod, 1992; 7:117-119.



Step toe PC and Edwards RG. Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet*, 1978; 312(8085):366.

Suikkari A, MacLachlan V, Koistinen R, Seppälä M, Healy D. Double-blind placebo controlled study: human biosynthetic growth hormone for assisted reproductive technology. *Fertil Steril*, 1996; 65:800–805.

Surrey ES. Endometriosis and assisted reproductive technologies: maximizing outcomes. *Semin Reprod Med*, 2013; 31(2):154-63.

Suzuki K, Yoshimoto N, Shimoda K, Sakamoto W, Ide Y, Kaneko T, Nakashima T, Hayasaka I, Nakagata N. Cytoplasmic dysmorphisms in metaphase II chimpanzee oocytes. *Reprod Biomed Online*, 2004; 9:54-58.

Suzuki T, Sasano H, Takaya R, Fukaya T, Yajima A, Nagura H. Cyclic changes of vasculature and vascular phenotypes in normal human ovaries. *Hum Reprod*, 1998; 13(4):953-9.

Tan TY, Lau SK, Loh SF, Tan HH. Female ageing and reproductive outcome in assisted reproduction cycles. *Singapore Med J*, 2014; 55(6): 305–309.

Tarin JJ and Pellicer A. Oocyte maturation in human in Vitro fertilisation programmes. *Ann Acad Med Singapore*, 1992; 21:492-497.

Taya K, Kaneko H, Watanabe G, Sasamoto S. Inhibin and secretion of FSH in oestrous cycle of cows and pigs. *J Reprod Fert*, 1991; 43: 151-62.

Tesarik J and Greco E. The probability of abnormal preimplantation development can be predicted by a single static observation on pronuclear stage morphology. *Hum Reprod*, 1999; 14(5):131823.



Tesarik J and Mendoza C. Effects of exogenous LH administration during ovarian stimulation of pituitary down-regulated young oocyte donors on oocyte yield and developmental competence. *Hum Reprod*, 2002; 17:3129–3137.

Tesarik J, Hazout A, Mendoza C. Enhancement of embryo developmental potential by a single administration of GnRH agonist at the time of implantation. *Hum Reprod*, 2004; 19(5):1176-80.

Tesarik, J, Hazout A, Mendoza C. Improvement of delivery and live birth rates after ICSI in women aged > 40 years by ovarian co-stimulation with growth hormone. *Hum Reprod*, 2005; p;20(9):2536-41. Epub 2005 Apr 28.

Tesarik J, Hazout A, Mendoza-Tesarik R, Mendoza N, Mendoza C. Beneficial effect of lutealphase GnRH agonist administration on embryo implantation after ICSI in both GnRH agonist and antagonist-treated ovarian stimulation cycles. *Hum Reprod*, 2006; 21(10):2572-9.

Tesarik J, Junca AM, Hazout A, Aubriot FX, Nathan C, Cohen-Bacrie P, Dumont-Hassan M. Embryos with high implantation potential after intracytoplasmic sperm injection can be recognized by a simple, non-invasive examination of pronuclear morphology. *Hum Reprod*, 2000; 15:1396–1399.

Tesarik J, Mendoza C, Greco E. Paternal effects acting during the first cell cycle of human preimplantation development after ICSI. *Hum Reprod*, 2002; 17(1):184-9.

Tesarik J, Mendoza N, Mendoza-Tesarik R. The neglected luteal phase after natural conception: rescue by early progesterone supplementation. *Curr Opin Gynecol Obstet*, 2019; 2: 216-220).

Tesarik J, Mendoza-Tesarik R, Mendoza N. Gonadotropin-releasing hormone agonist for luteal phase support: the origin of the concept, current experience, mechanism of action and future perspectives. *Fertil Steril*, 2016; 106(2):268-9.



Tesarik J. In vitro fertilization turns 40: highlights in time travel. *J Gynecol Women's Health*, 2017; 4(4):555-649.

Tesarik J. Is blastomere multinucleation a safeguard against embryo aneuploidy? Back to the future. *Reprod Biomed Online*, 2018; 37:506-507

Tesarik J. Sex chromosome abnormalities after intracytoplasmic sperm injection. *Lancet*, 1995; 346(8982):1096.

Tolga B, Mesen, MD, Steven L. Young, MD. Progesterone and the Luteal Phase. *Obstet Gynecol Clin North Am*, 2015; 42(1): 135–151.

Trounson AO, Leeton JF, Wood C, Webb J, Wood J. Pregnancies in humans by fertilization in vitro and embryo transfer in the controlled ovulatory cycle. *Science*, 1981; 212(4495): 681-682

Tse Yeun Tan M, Sie Kuei Lau, M, Seong Feei Loh, F, Heng Hao Tan, M. Female ageing and reproductive outcome in assisted reproduction cycles. *Singapore Med J*, 2014; 55(6): 305–309.

Urman B, Tiras B, Yakin K. Assisted reproduction in the treatment of polycystic ovarian syndrome. *Reprod Biomed Online*, 2004; 8(4):419-30.

Van Blerkom J, Davis P, Alexander S. Differential mitochondrial distribution in human pronuclear embryos leads to disproportionate inheritance between blastomeres: relationship to microtubular organization, ATP content and competence. *Hum Reprod*, 2000; 15:2621-2633.

Van Blerkom J, Henry G. Oocyte dysmorphism and aneuploidy in meiotically mature human oocytes after ovarian stimulation. *Hum Reprod*, 1992; 7:379-390.

Van Blerkom J. Occurrence and developmental consequences of aberrant cellular organization in meiotically mature human oocytes after exogenous ovarian hyperstimulation. *J Electron Microscop Tech*, 1990; 16:324-346.



Van Der Linden M, Buckingham K, Farquhar C, Kremer JA, Metwally M. Luteal phase support for assisted reproduction cycles. *Cochrane Database Syst Rev*, 2011; 5(10):CD009154.

Van Montfoort AP, Dumoulin JC, Kester AD, Evers JL. Early cleavage is a valuable addition to existing embryo selection parameters: a study using single embryo transfers. *Hum Reprod*, 2004; 19:2103-2108.

Van Royen E, Mangelschots K, Vercruyssen M, De Neubourg D, Valkenburg M, Ryckaert G, Gerris J. Multinucleation in cleavage stage embryos. *Hum Reprod*, 2003; 18:1062-1069.

Van Royen, Mangelschots K, De Neubourg D, Valkenburg M, Van de Meerssche M, Ryckaert G, Eestermans W, Gerris J. Characterisation of a top quality embryo, step towards single-embryo transfer. *Hum Reprod*, 1999; 14: 2345-9.

Vanegas H. Regulación neuroendocrina del ciclo menstrual. En: Terán Dávila J, Febres Balestrini F, editores. *Endocrinología Ginecológica y Reproducción Humana*. Caracas: Ateproca, 1995; p.15-41.

Veeck LL. Abnormal morphology of the human oocyte and conceptus. En: *An atlas of human gametes and conceptuses. An illustrated reference for assisted reproductive technology*. New York: The Parthenon Publishing Group Inc., 1999b; p. 57-68.

Veeck LL. Preembryo grading and degree of cytoplasmic fragmentation. En: *An atlas of human gametes and conceptuses. An illustrated reference for assisted reproductive technology*. New York: The Parthenon Publishing Group Inc., 1999a; p. 46-51.

Veeck LL. The cleaving human pre-embryo. *An atlas of human gametes and conceptus: an illustrated reference for assisted reproductive technology*. Ed. The Parthenon Publishing, New York, 1999; P. 40-50.



Verlinsky Y, Lerner S, Illkevitch N, Kuznetsov V, Kuznetsov I, Cieslak J, Kuliev A. Is there any predictive value of first polar body morphology for embryo genotype or developmental potential? *Reprod Biomed Online*, 2003; 7:336-341.

Visser JA, de Jong FH, Laven JS, Themmen AP. Anti-Mullerian Hormone Reproduction: a new marker for ovarian function. *Soc For Reprod an fertile*, 2006; 131,1-9.

Wallbutton S and Kasraie J. Vacuolated oocytes: fertilization and embryonic arrest following intra-cytoplasmic sperm injection in a patient exhibiting persistent oocyte macro vacuolization—case report. *J Assist Reprod and Genet*, 2010; 27: 183–188.

Wei Wang, Xue-Hong Zhang, Wei-Hua Wang, Ya-Li Liu, Li-Hui Zhao, Shi-Long Xue, Ke-Hu Yang. The time interval between hCG priming and oocyte retrieval in ART program: a meta-analysis. *J Assist Reprod Genet*, 2011; 28(10): 901–910.

Weissman A and Shoham Z. Favourable pregnancy outcome after administration of a long-acting gonadotropin-releasing hormone agonist in the mid-luteal phase. *Hum Reprod*, 1993; vol. 8 (pg. 496-497).

Westergaard LG, Laursen SB, Andersen CY. Increased risk of early pregnancy loss by profound suppression of luteinizing hormone during ovarian stimulation in normogonadotrophic women undergoing assisted reproduction. *Hum Reprod*, 2000; 15:1003-8.

Williams JC and Erickson GF. Morphology and Physiology of the Ovary. In: Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, Chrousos G, Dungan K, Grossman A, Hershman JM, Kaltsas G, Koch C, Kopp P, Korbonits M, McLachlan R, Morley JE, New M, Perreault L, Purnell J, Rebar R, Singer F, Trencze DL, Vinik A, Wilson DP, editors, 2012.

Wilshire GB, Emmi AM, Gagliardi CC, Weiss G. Gonadotropin-releasing hormone agonist administration in early human pregnancy is associated with normal outcomes. *Fertil Steril*, 1993; vol. 60 (pg. 980-983).



Wood C, McMaster R, Rennie G, Trounson A, Leeton J. Factors influencing pregnancy rates following in vitro fertilization and embryo transfer. *Fertil Steril*, 1985; 43:245–250.

Wu H-M, Huang HY, Lee CL, Soong YK, Leung PC, Wang HS. Gonadotropin-releasing hormone type II (GnRH-II) agonist regulates the motility of human decidual endometrial stromal cells: Possible effects on embryo implantation and pregnancy. *Biol Reprod*, 2015; 92(4):98,1-11.

Wu MY, Chen HF, Ho HN, Chen SU, Chao KH, Huang SC, Lee TY, Yang YS. The value of human growth hormone as an adjuvant for ovarian stimulation in a human in vitro fertilization program. *J Obstet Gynaecol Res*, 1996; 22:443–450.

Xia P. Intracytoplasmic sperm injection: correlation of oocyte grade based on polar body, perivitelline space and cytoplasmic inclusions with fertilization rate and embryo quality. *Hum Reprod*, 1997; 12:1750-1755.

Xue-Mei W, Hong J, Wen-Xiang Z, Yang L. The effects of growth hormone on clinical outcomes after frozen-thawed embryo transfer. *Int J Gynaecol Obstet*, 2016; 133(3):347-350.

Yoon HJ, Yoon SH, Son WY, m KS, Lim JH. High implantation and pregnancy rates with transfer of human hatching day 6 blastocysts. *Fertil Steril*, 2001;75:832-833.

Young DC, Snabes MC, Poindexter AN. GnRH agonist exposure during the first trimester of pregnancy. *Obstet Gynecol*, 1993; vol. 81 (pg. 587-589).

Zhao J, Taverne M, Van Der Weijden GC, Bevers MM. Immunohistochemical localisation of growth hormone (GH), GH receptor (GHR), insulin-like growth factor I (IGF-I) and type I IGF-I receptor, and gene expression of GH and GHR in rat pre-antral follicles. *Zygote*, 2002; 10:85–94.

Zhao M, Shirley CR, Hayashi S, Marcon L, Mohapatra B, Suganuma R, Behringer RR, Boissonneault G, Yanagimachi R, Meistrich ML. Transition nuclear proteins are



required for normal chromatin condensation and functional sperm development. *Genesis*, 2004; 38(4):200-13.

Ziebe S, Petersen K, Lindenberg S, Andersen AG, Gabrielsen A, Andersen AN. Embryo morphology or cleavage stage: how to select the best embryos for transfer after in-vitro fertilization. *Hum Reprod*, 1997; 12:1545-1549.

Zollner U, Zollner KP, Hartl G, Dietl J, Steck T. The use of a detailed zygote score after IVF/ICSI to obtain good quality blastocysts: the German experience. *Hum Reprod*, 2002; 17(5):1327-33.

